

**Elektronenmikroskopische Lokalisierung von Proteinen
auf der Oberfläche ribosomaler Untereinheiten von
Escherichia coli mittels spezifischer Antikörper**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Matthias Wabl
aus Graz

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Elektronenmikroskopische Lokalisierung von Proteinen auf der Oberfläche ribosomaler Untereinheiten von Escherichia coli mittels spezifischer Antikörper

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des
Fachbereichs Biologie (23)
der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Matthias Wabl
aus Graz

Berlin 1973



1. Gutachter: Prof. H.G. Wittmann

2. Gutachter: Prof. G. Kümmel

Tag der mündlichen Prüfung:

5. März 1973

1. Einleitung

2. Metall-Licht-Systeme

2.1 Platin

2.2 Goldsystem

2.3 Silbersystem

2.4 Silber-Licht-Systeme

2.5 Elektrochemische Systeme

3. Herstellung der Elektroden

3.1 Silber-Licht-Systeme

3.2 Silber-Licht-Systeme

3.3 Silber-Licht-Systeme

3.4 Silber-Licht-Systeme

3.5 Silber-Licht-Systeme

3.6 Silber-Licht-Systeme

und

Renate

4. Herstellung der Elektroden

4.1 Silber-Licht-Systeme

5. Lokalisierung des Elektrodenmaterials

5.1 Silber-Licht-Systeme

6. Literaturverzeichnis

7. Anhang

7.1 Silber-Licht-Systeme

7.2 Silber-Licht-Systeme

7.3 Silber-Licht-Systeme

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	2
2. Material und Methode	5
2.1 Puffer	5
2.2 Ribosomen	5
2.3 Antikörper	5
2.4 Ribosomen-Antikörper-Komplex	6
2.5 Elektronenmikroskopie	8
3. Morphologie der ribosomalen Untereinheiten	10
3.1 50 S Untereinheit	10
3.2 Diskussion der Präparationsverfahren	13
3.3 Ribosomenliteratur unter besonderer Berücksichtigung der 50 S Untereinheit	17
3.4 30 S Untereinheit	21
3.5 Diskussion	24
4. Verwendung von Antikörpern zur Markierung in der Elektronenmikroskopie	28
5. Lokalisierung von ribosomalen Proteinen der 50 S Untereinheit	31
6. Literaturverzeichnis	36
7. Anhang	
7.1 Nomenklatur ribosomaler Proteine	45
7.2 Danksagung	47
7.3 Lebenslauf	49

ZUSAMMENFASSUNG

Diese Arbeit befaßt sich mit der elektronenmikroskopischen Lokalisierung von Proteinen an der Oberfläche des Ribosoms von E. coli. Es wurde erstmals eine reproduzierbare Gestalt für das 30 S Partikel gefunden. Ein daraus abgeleitetes vorläufiges Modell konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen von gekippten Präparaten bestätigt werden. An zwei elektronenmikroskopisch definierten Formen des 50 S Partikels wurden drei ribosomale Proteine mittels spezifischer Antikörper lokalisiert.

I. EINLEITUNG

An den Ribosomen werden die Proteine in der Zelle synthetisiert. Die für die vorliegende Arbeit über E. coli Ribosomen wichtigen Charakteristika sind: Das Gesamtpartikel sedimentiert in der Zentrifuge mit 70 S. Es zerfällt bei Magnesiumionenkonzentrationen unter 1 mM in eine große Untereinheit, die mit 50 S, und in eine kleine Untereinheit, die mit 30 S sedimentiert. Die Sedimentationskonstanten dienen auch als Bezeichnungen für die entsprechenden Partikel. Das Molekulargewicht von 70 S beträgt 2.7×10^6 , von 30 S 0.9×10^6 , von 50 S 1.8×10^6 . Die 30 S Untereinheit besteht aus einem RNS Molekül und 21 verschiedenen Proteinen, die 50 S Untereinheit aus 2 ungleichen RNS Molekülen und 34 Proteinen, wovon wahrscheinlich zwei Proteine in jeweils zwei Exemplaren auftreten. Das Mengenverhältnis von RNS zu Protein beträgt in beiden Untereinheiten 2 : 1.

Die Proteine und die RNA Moleküle sind recht gut charakterisiert. So weiß man von den Proteinen die Molekulargewichte, den isoelektrischen Punkt und die Aminosäurezusammensetzung, teilweise sind deren Sequenz und Funktion bekannt.

Es gelang auch, die Untereinheiten (30 S und 50 S) in ihre Bestandteile zu zerlegen und wieder zu funktionsfähigen Partikeln zu rekonstituieren.

Im Gegensatz zur relativ weit fortgeschrittenen Biochemie der Ribosomen und der Proteinsynthese (Übersichten geben Wittmann et al., 1972; Kurland, 1972) ist das Wissen um den räumlichen Aufbau seit den ersten elektronenmikroskopischen Arbeiten von Hall et al. (1959) und Huxley et al. (1960) im Ansatz steckengeblieben. Es besteht keine Sicherheit über die dreidimensionale Form der einzelnen Partikel (70 S, 30 S, 50 S). Sogar bei den zweidimensionalen Formen auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen besteht keine Übereinstimmung in den zahlreichen Arbeiten verschiedener Autoren (siehe Übersichtsartikel Nanninga 1972).

Röntgenographische Untersuchungen waren bislang nicht möglich, da Ribosomen noch nicht kristallisiert werden konnten. Die Röntgenkleinwinkelbefunde (Hill, 1969, 1970) lieferten noch ungenauere Daten als die elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Bei diesem Wissensstand um den dreidimensionalen Aufbau scheint es auf den ersten Blick zu weit gegriffen, einzelne Proteine innerhalb der Ribosomenstruktur lokalisieren zu wollen. Doch werden zur Zeit in einigen Laboratorien Proteinnachbarschaftsbeziehungen mit chemischen Methoden untersucht (reaktives Vernetzen benachbarter Proteine, anschließendes Auftrennen des Ribosoms in die einzelnen Bestandteile nach einer Standardmethode, sowie Identifizierung der Vernetzungsprodukte).

Elektronenmikroskopisch ist folgender Ansatz möglich: Falls ribosomale Partikel auf elektronenmikroskopischen Aufnahmen reproduzierbare Formen zeigen, kann versucht werden, spezifische Antikörper anzukoppeln und diese und damit die entsprechenden Proteine auf den mikroskopischen Aufnahmen zu identifizieren. Die Markierung wird benötigt, weil verschiedene Proteine sich nicht verschieden abbilden. Weitergehend können eventuell dadurch verschiedene reproduzierbare Partikelformen räumlich zueinander in Beziehung gesetzt werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich zunächst mit den reproduzierbaren Formen der ribosomalen Untereinheiten, um dann die Methode zu erarbeiten, an diesen Formen einzelne Proteine zu lokalisieren. Zur Lokalisierung werden Antikörper verwendet. Antikörper sind Proteine, die im Immunsystem höherer Organismen zur Abwehr organismusfremder Stoffe entwickelt werden. Sie reagieren mit einer in der Biochemie sonst nicht erreichten Spezifität mit dem "Antigen", dem Stoff, gegen den sie entwickelt wurden. Antikörper sind bivalent, die Spezifität ist an den beiden oberen Enden des Y förmigen Moleküls festgelegt. Antikörper, entwickelt gegen jeweils nur ein ribosomales Protein, werden mit den Ribosomen reagiert. Es wird vorausgesetzt, daß dann der Fab-Teil, das ist der die Spezifität tragende Arm des Y förmigen Antikörpers, zur antigenen Determinante des Oberflächenproteins zeigt, das heißt, die Position der Determinante des Proteins am Ribosom hinlänglich genau bestimmt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Puffer

Der Standardpuffer für die vorliegende Arbeit setzte sich zusammen aus: 0.01 M Tris-HCl, 0.06 M NH_4Cl , 1 mM MgCl_2 , 6 mM β -Mercapto-Äthanol; pH 7.6. Für die elektronenmikroskopische Kontrolle der Partikelverteilung wurden noch folgende Puffer verwendet: TSM I Puffer: 0.01 M Tris HCl, 0.01 MgCl_2 , 0.003 M Bernsteinsäure, 0.3 M KCl, 0.006 M β -Mercapto-Äthanol; pH 7.6.

Puffer A1: 0.01 Tris-HCl, 5 mM MgCl_2 , 0.06 M KCl; pH 7.4.

Puffer A2: 0.01 Tris-HCl, 10 mM MgCl_2 , 0.06 M KCl; pH 7.4.

2.2 Ribosomen

Ribosomen bzw. deren Untereinheiten wurden isoliert nach der Methode beschrieben von Gesteland (1966). Wenn nicht anders beschrieben, wurden die Ribosomenpräparationen gegen den Standardpuffer dialysiert und für 10 min bei 37° inkubiert.

2.3 Antikörper

Antikörper gegen einzelne gereinigte Proteine wurden in Kaninchen erzeugt und nach Molekulargewicht aufgetrennt (Stöffler et al., 1971). Das erhaltene Immunglobulin G (IgG) enthielt ungefähr 1 % Antikörper gegen das ribosomale Protein. Die Präparate wurden lyophilisiert bei 4° aufbewahrt (zur Struktur des "IgG" siehe Kapitel 4).

2.4 Ribosomen-Antikörperkomplex

Zu 500 μ l einer Suspension von 50 S im Standardpuffer (Totalabsorption als Maß für die Menge $A_{260} = 10.0$) wurden verschiedene Mengen (0.5 bis 7 mg) IgG Antikörper in 200 μ l Standardpuffer (gelöst bei Zimmertemperatur) bei 37⁰ zugegeben. Nach drei Minuten wurde die Mischung für eine Stunde auf Eis gestellt. Die Probe wurde dann auf eine Sepharose 6B Säule, 92 x 1 cm, Durchflußgeschwindigkeit 4.5 bis 6.0 ml/g gebracht. War die Probe vor dem Säulenauftrag nicht klar - gelöste Antikörper können in der Kälte wieder ausfallen - wurde 2 min bei 14 000 g in der Beckman Microfuge abzentrifugiert. Die Sepharose 6B Säule wurde für die Versuche mit jeweils Anti- L1, L 19, L 27* verwendet. Ultrazentrifugenstudien zeigten, daß 50 S Proben mit jeweils den Antikörpern Anti- L1, L19, L 27 einen hohen Prozentsatz (30 bis 50 %) an 50 S Dimeren ergaben (C. A. Morrison, persönliche Mitteilung). Die Sepharose 6B Säule trennt Dimere und höhere Aggregate von 50 S Monomeren und von den nicht reagierten Antikörpern (IgG Präparationen enthalten Antikörper gegen verschiedene antigene Determinanten desselben Proteins in einer Menge von etwa 1 %, 99 % der Antikörper stammen aus der Immunvergangenheit des Versuchstieres und sind somit nicht gegen das ribosomale Protein gerichtet). Proben aus den drei verschiedenen Peaks wurden im Elektronenmikroskop untersucht; auch wurde das Verhältnis der optischen Absorption $A_{260} : A_{280}$ zur Peakidentifikation herangezogen.

* Proteinomenklatur siehe Kapitel 7.1.

Durch den Antikörper werden die beiden Komponenten der Dimerenkomplexe in einer charakteristischen Konfiguration gehalten. Dadurch wird das Auffinden des Antikörpers zwischen den Ribosomenpartikeln erleichtert. Monomere mit gebundenem Antikörper liegen seltener in einer für die Sichtbarmachung des Antikörpers günstigen Position. Zudem könnten aus dem Ribosom herausragende Proteinfäden als Antikörper gedeutet werden. Um möglichst viele Dimere zu erhalten, sollte das Teilchenverhältnis Ribosomen zu Antikörper 2 : 1 betragen. Jedoch ist der Titer der IgG Präparation schwer zu ermitteln, weiterhin werden am Ribosom nicht alle Determinanten eines Proteins an der Oberfläche frei zugänglich sein, so daß sich der effektive Titer nach noch niedrigeren Werten hin verschiebt. Daher wurde aus Testläufen derjenigen mit dem besten Dimerenpeak für die elektronenmikroskopische Präparation ausgewählt. Kriterien hierfür waren gute Peakauflösung und eine Mindestkonzentration entsprechend $A_{260} = 0.5/\text{ml}$. Ein typisches Auftrennungsprofil eines Säulenlaufes (für Anti-L 27) ist in Fig. 2 wiedergegeben. Kontrollläufe wurden mit 2 mg oder 4 mg Non-Immun-Serum IgG (NIS IgG, das sind Antikörper aus dem Serum von Tieren, bevor sie mit ribosomalen Proteinen immunisiert wurden) durchgeführt (Fig. 1).

Für den Versuch mit Anti L7, L12 (L7 und L12 haben identische Antiseren) wurde für die Säule Agarose mit einem Ausschlußvolumen von 1.5×10^6 verwendet.

2.5 Elektronenmikroskopie

Anfangs wurde die Methode von Huxley et al. (1960) benutzt. Sie verwendet Lochfilme mit über den Löchern aufgespannten dünnen Kristallschichten. Es zeigte sich jedoch, daß der Kontrast nicht merkbar besser war als bei der normalen Kohlefilmpräparation. Ein Nachteil der Methode liegt in der Instabilität der Kristallschichtfilme, die über die Löcher aufgespannt werden. Die durch das Reißen der Filme entstehende Drift macht scharfe Aufnahmen schwer möglich und verzerrt auch die Partikelgestalt. Bei der Untersuchung von Antikörper-Ribosomenkomplexen macht sich ein weiterer Nachteil bemerkbar: Über den Löchern im Trägerfilm schwimmen die Komplexe bis zum Auskristallisieren in einer Uranylacetatlösung (Kontrastmittel), was wegen des hohen pH-Wertes zur Dissoziation führen kann. Dies wurde auch in Vorversuchen gefunden. Konnte sich hingegen der Ribosomen-Antikörperkomplex vor der Kontrastierung an einen Kohlefilm anheften, so wird bei der Dissoziation der Antigen-Antikörperbindung die Position der Komponenten des Komplexes nicht mehr verändert. Daher wurde wie folgt vorgegangen: Eine Glimmerplatte wurde frisch gespalten und darauf im Vakuum ein äußerst dünner Kohlefilm aufgedampft. Damit dieser Film auf Grund von Unregelmäßigkeiten durch Aufheizung im Elektronenstrahl nicht zerreißt, wurde er indirekt, d. h. durch Ablenkung des Dampfstrahls an einer Glasfläche bedampft (Whiting et al., 1972). Diese Filme waren äußerst homogen und damit stabil. Sie wurden auf die Präparatlösung mit einer Partikelkonzentration entsprechend

der Absorption $A_{260} = 1.0/\text{ml}$ gefloatet. Die Partikel treffen durch Diffusion auf den Film und werden dort adsorbiert (Valentine, 1968). Nach einer Minute wurde der nun beladene Film zur Kontrastierung der Partikel auf eine Lösung von 0,5 % Uranylacetat, pH 4,4, übertragen. Nach einer Minute wurden Kupfer-Trägernetze, befilmt mit einem dicken löchrligen Kohlefilm auf den Film mit den adsorbierten und nun kontrastierten Partikeln aufgelegt. Die Glitter wurden sofort aufgenommen und auf Filterpapier getrocknet. Alle Arbeitsgänge wurden bei 4° ausgeführt (schematische Darstellung siehe Fig. 3). Durch die beschriebene Präparationstechnik erhielt man oft Film "sandwiches", d. h., der mit den Partikeln beladene Film faltete sich zurück, während er auf der Uranylacetatlösung flotierte. Die Kontrastmittelverteilung auf dem Film hängt von dessen lokaler Beschaffenheit (hydrophil - hydrophob) ab. In der Doppelschicht wird eine gleichmäßige Verteilung erzwungen, so daß die im Bild gefundene Kontrastverteilung nur durch das Objekt bestimmt wird. Derart entstandene Bereiche wurden daher für Photographien bevorzugt.

Für die Untersuchung der Antikörper-Ribosomenkomplexe wurde ein Siemens Elmiskop 1A benutzt, bei 80 kV Strahlspannung, Feinstrahlbeleuchtung, $50\text{ }\mu\text{m}$ Objektivapertur und einer elektronenoptischen Vergrößerung von 65.000. Zur Vermeidung von Objektkontamination war die Objektraumkühlung in Betrieb.

Für die Arbeit am 30 S Partikel und am 50 S Partikel wurde auch ein Philips EM 300 Elektronenmikroskop verwendet, mit 60 kV, $30\text{ }\mu\text{m}$ Aperturblende, und einer Primärvergrößerung von 82.000.

Kippen des Präparates im Elektronenmikroskop

Die Aufnahmen wurden bei 80 kV mit einem Philips EM 300, ausgerüstet mit einem Goniometer, gemacht. Die Primärvergrößerungen auf dem 35 mm Film waren 30,000 und 36,000 x. Aufnahmen wurden bei Kippwinkeln von $+ 30^{\circ}$ ($+ 45^{\circ}$) und $- 30^{\circ}$ ($- 45^{\circ}$) gemacht. Auf der Fotografie konnte die Kippachse leicht durch Verfolgen des Defokussierungsverlaufs bestimmt werden. Um bei den Aufnahmen der gekippten Proben die Bildänderung, die durch verschiedene Partikelpositionen im Elektronenstrahl entsteht, vom Effekt der Bildverkürzung durch Kippen zu trennen, wurden Fotografien, die bei 0° Goniometerwinkel gemacht wurden, noch einmal fotografiert, und zwar bei gleicher Kippachse unter dem Winkel, der auch beim Goniometer benutzt wurde (30° bzw. 45°). Diese Kontrolle ist in Fig. 4 schematisch dargestellt.

3. Morphologie der ribosomalen Untereinheiten

3.1 Die 50 S Untereinheit

Verteilung der Partikel auf dem Film

Die Lokalisierung der Proteine wird an Dimeren vorgenommen, die durch Antikörper gebildet werden. Daher wurde zunächst die Verteilung der Partikel - Monomere, Dimere und höhere Aggregate - in Abhängigkeit von Präparationsparametern untersucht. Dabei spielt die Magnesiumkonzentration im verwendeten Puffer eine

wesentliche Rolle: In der Arbeit von Huxley et al. (1960) traten die 50 S Partikel bei einer Magnesiumkonzentration von 1 mM als Monomere auf, bei einer Konzentration von 5 mM als Dimere. Bei bestimmten Verhältnissen der Magnesiumionenkonzentration zur Kaliumionenkonzentration können auch höhere Aggregate entstehen (Nonomura et al., 1971), ein Effekt, der auch durch Ablösung zweier Proteine vom 50 S Partikel herrühren kann (Nisbet et al. 1971).

Fig. 5 zeigt hauptsächlich Monomere, obwohl die Magnesiumkonzentration des verwendeten Puffers (Puffer A) 5 mM war. Gute Verteilung gab der TSM Puffer, wobei erstaunlicherweise (10 mM Mg!) fast keine Dimere auftraten (Fig. 6) und der Standardpuffer, der später für alle weiteren Versuche verwendet wurde (Fig. 24). Weite Aggregationen von 50 S Partikeln im Puffer A2 zu vorwiegend linearen Verästelungen wurden nach Huxley's (1960) Methode gefunden (Fig. 7). Manchmal werden dabei Ringe gefunden, die sich zumeist der Lochform anpassen (Fig. 8). Diese Ringe sind vermutlich auf Oberflächenphänomene zurückzuführen.

Form der 50 S Partikel

Auf den ersten Blick erscheint die 50 S Untereinheit als rundes Partikel. Das hat wohl auch zu der Annahme geführt, es sei elektronenmikroskopisch wesentlich leichter zu erfassen als das 30 S Partikel. Die Tatsache, daß die 50 S Untereinheit rundlich ist, läßt eine Vielzahl von eigentlich verschiedenen Projektionen mehr oder minder gleich erscheinen. Vorliegende Arbeit beschränkt

sich darauf, zwei häufig auftretende und reproduzierbare Formen zu beschreiben, um sie später bei der Proteinlokalisation zu benutzen. Diese Formen werden in Fig. 10 in Einzelbildern gezeigt, und auch in Fig. 25 schematisch nachgezeichnet. Sie sind im Übersichtsbild der Fig. 9 häufig zu sehen (a häufiger als b). Fig. 9 zeigt in a hauptsächlich Bilder, die einem zerrissenen Fünfeck ähneln und an eine Krone erinnern, in b Bilder, die halbkreisähnlich sind und eine Kerbe haben, die asymmetrisch auf der geraden Umrißlinie des Partikels liegen.

Um die beiden Bilder sterisch in Beziehung setzen zu können, wurden 50 S Präparate im Elektronenmikroskop gekippt. Auf den ersten Blick kann der Figur 11 entnommen werden, daß sich die Aufnahmen von gekippten Präparaten kaum von den ungekippten unterscheiden, obwohl die Winkeldifferenz 45° betrug. Kippen der Fotografien bei 0° Goniometerstellung und erneutes Fotografieren dieser Aufnahmen zeigten fast identische Bilder (siehe Methoden). Obwohl die Abbildungen jedes einzelnen Partikels auf eine Änderung nach Kippen im Mikroskop untersucht wurden, wurde doch das Hauptaugenmerk auf die Möglichkeit gelegt, Form a der Figur in Form b überzuführen. Aufgrund der in der Literatur versuchten Modellansätze (Lubin 1968) wurde als Kippachse die Achse untersucht, die in der Figur senkrecht verläuft. Diese Versuche brachten keinen Erfolg. Es sind jedoch in Fig. 12 Bilder mit leicht schräger Achse in Bezug auf die Nachzeichnungen der Fig. 25 wiedergegeben. Diese waren die einzigen Bilder, die überhaupt eine leichte, wenn auch

nicht überzeugende Änderung erkennen ließen (von der Kronenform in die Halbkreisform).

(Diskussion der Kippergebnisse siehe 3.5).

3.2 Diskussion der Präparationsverfahren

Über das 50 S Partikel gibt es eine Reihe von Veröffentlichungen, die sich in ihrem Ergebnis alle unterscheiden. Das kann zunächst einmal an der jeweiligen Isolierungsart liegen (man kann "rohe" Ribosomen nehmen und gewaschene in 0,5 M oder 1 M NH_4Cl , die beiden Ribosomenarten unterscheiden sich durch ihre Proteinzusammensetzung, z.B. fehlt das Protein S 21 bei gewaschenen 30 S Ribosomen).

Weiter kann dies an einer strukturellen Heterogenität liegen, das heißt, es gibt verschiedene Ribosomentypen mit verschiedenen Aufgaben bei der Proteinsynthese, oder einen Typ in verschiedenen Zuständen entsprechend den Schritten der Proteinsynthese. Dadurch könnten die verschiedenen, im Elektronenmikroskop gefundenen Strukturen erklärt werden. In diesem Zusammenhang wird oft die Arbeit von Voynow et al. (1971) zitiert, die zeigte, daß für die 30 S Untereinheit jedes der 21 Proteine höchstens einmal im individuellen Partikel zu finden ist, einige Proteine jedoch in einigen Partikeln fehlen (Substöchiometrie). Das gleiche wurde für das 50 S festgestellt (Weber, 1972). Für das 30 S Partikel wurde dieser Befund zum Anlaß genommen, um die ziemlich undefinierbaren Formen der 30 S Untereinheiten, wie sie bislang gefunden wurden, zu er-

klären. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dürfte eine strukturelle Heterogenität kaum so drastisch sein, daß sie sich in der elektronenmikroskopisch darstellbaren Form niederschlägt. Die Hauptschwierigkeit der Darstellbarkeit der Ribosomen im Elektronenmikroskop liegt in deren labiler Struktur. Anders als die Viruspartikel (Figur 23 zeigt ein STNV Virus von ähnlicher Größe wie die 50 S Ribosomen) haben die Ribosomen keine feste Proteinhülle; in ihnen sind Proteine und RNS im Mengenverhältnis 1:2 (für Prokaryonten) in nicht kristalliner Anordnung zusammengefügt. Selbst bei so kompakten Partikeln wie Viren konnten Verformungen durch die Präparation festgestellt werden (Klug et al., 1968). Umso mehr muß dies bei Ribosomen der Fall sein. Dazu kommt noch, daß Ribosomen in hohem Maße hydratisiert sind, was beim Trocknen im Vakuum (im Mikroskop) eventuell zum Zusammenbruch der Struktur führen kann, wird diese nicht anderweitig geschützt.

Durch Fixierung (chemisches Vernetzen der Aminogruppen in den Proteinen) kann erhöhte Stabilität der Ribosomen erreicht werden. In dem Sinne, daß die Proteine nicht mehr leicht zu trennen sind. Ausgedehnte Fixierungsstudien für die Elektronenmikroskopie der 50 S Partikel wurden von Lubin (1968) durchgeführt. Die von ihm gezeigten Bilder unterscheiden sich allerdings in der Qualität nicht von den Bildern unfixierter 50 S Partikel der vorliegenden Arbeit. Fixierung wurde benötigt in der Studie von Huxley (1960), vermutlich, weil das Negativkontrastmittel (Phosphorwolframsäure) den Ribosomen das Magnesium entzog, ein Vorgang, der eine Auflösung

der Ribosomenstruktur bewirkt (Gesteland 1966). Durch Fixierung muß jedoch nicht die Gestalttreue der Wiedergabe erhöht werden. Zum Beispiel können Strukturelemente (wie die Rille im 60 S, Nonomura et al., 1971) verstärkt ausgeprägt auftreten.

Einfluß des Kontrastierungsverfahrens auf Ribosomen-Präparationen

Schrägbedampfung

Im Vakuum der Bedampfungsanlage trocknen die Partikel völlig aus, was zur Zerstörung der Struktur führen kann. Zudem erzeugt Platinbedampfung eine relativ grobe Körnigkeit, so daß die Auflösung an so kontrastierten Präparaten gering ist. Wolframbedampfung (Hart 1965, Vasiliev 1971) mit geringer Körnigkeit war aus technischen Gründen für die vorliegende Arbeit nicht möglich. Außerdem würde die Sichtbarmachung eines Antikörpers zwischen zwei Ribosomenpartikeln durch die Menge angehäuften Bedampfungsmaterials oder durch Abschattung durch die Ribosomen erschwert werden.

Positivkontrast

Positivkontrastierung entsteht im Fall der Ribosomen durch Bindung der Uranylionen an die RNS und würde bei nicht völliger Raumausfüllung des Partikels durch Nukleinsäure eine Form vortäuschen, die nicht der Partikelgestalt entspricht.

Negativkontrast

Bei Negativkontrastierung kann eine Auflösung von etwa 20 Å erreicht werden. Dies ist zur Aufklärung der Form des Ribosoms beim gegenwär-

tigen Stand der Isolierungs- und Präparationstechniken ausreichend, da die auftretenden Formvariationen diesen Betrag überschreiten. Im Gegensatz zum Positivkontrastieren trägt die Einhüllung mit Kontrastmittel zur Stabilisierung der Form des Partikels bei. Das ist dadurch bedingt, daß das Negativkontrastmittel auskristallisiert, bevor das Ribosomenpartikel dehydratisiert ist.

Die beobachtete Kontrastarmut in Negativkontrastbildern von Ribosomen ist darauf zurückzuführen, daß das Kontrastmittel in die offene ("schwammige") Struktur eindringen kann. Im Falle des Uranylacetats wird das Partikel innerhalb seiner Umrisse auch positiv angefärbt und schwächt somit die Kontrastdifferenz zur Umgebung des Partikels.

Zur Auswahl des Negativkontrastmittels: In der Literatur wurden für Ribosomenpräparationen Phosphorwolframsäure (Huxley et al., 1960), Uranylacetat (Miller et al., 1966; Nanninga, 1967; Nonomura et al., 1971), Uranyloxalat, Ammoniummolybdat und Uranylformiat (Lubin, 1968) verwendet. Uranylacetat ergab den besten Kontrast, was auch durch eigene Vorversuche festgestellt wurde.

Fixierung der Partikel ist dabei nicht nötig. Obwohl der pH relativ niedrig ist (pH 4.4), zeigten sich im Ribosomenbild keine Unterschiede etwa zu Uranyloxalat, das auf pH 6.9 eingestellt werden kann.

3.3 50 S Untereinheit in der Literatur

Alle oben beschriebenen Verfahren wurden bisher in den Arbeiten über das 70 S, 50 S und 30 S benutzt: Schrägbedampfung mit Platin wurde in der Arbeit von Hall et al. (1959) verwendet. Die 50 S Untereinheit erschien dabei ungefähr als Kugel. In einer anderen Arbeit (Nanninga, 1968) wurde aus den Schattenumrissen platinbedampfter 50 S Partikel auf die Gestalt eines Icosaeders geschlossen. Derartige Regelmäßigkeit in der Struktur ist bei der Verschiedenheit der Proteinzusammensetzung unwahrscheinlich (vermutlich kommen nur zwei Proteine mehr als einmal am selben Partikel vor). Außerdem berücksichtigen die Schattenumrisse nur die Konturen, die sich am weitesten senkrecht zur Richtung des Dampfstrahls erstrecken. Sicherlich finden sich im zweidimensionalen Bild negativ kontrastierter Partikel auch fünfeckige Formen. Daraus können aber keine derart weitgehende Modellvorstellungen entwickelt werden. Ribosomen aus Feigenfrüchten wurden mit Uran bedampft (Marei et al., 1971). Aus diesen Bildern ist aber kaum mehr Information zu erhalten, als daß die Ribosomen Partikel sind. Platinbedampfte 50 S Partikel von E. coli in der Arbeit von Amelunxen (1971 a) zeigten kugelige, wenn auch kaum genaue Struktur, platinbedampfte 60 S Partikel von Pisum sativum wurden vom selben Autor als Tunnel beschrieben (Amelunxen et al., 1971 b). Hierzu sollte man anmerken, daß zwischen Ribosomen von Eukaryonten und Prokaryonten nicht nur Unterschiede in der Größe, sondern auch in der Proteinzahl und im Mengenverhältnis RNS zu Protein bestehen (für Prokaryoten RNS: Protein 2 : 1, für Eukaryoten 1 : 1). Daher scheint es wohl möglich, daß sich diese Ribosomen auch in

der dreidimensionalen Struktur unterscheiden, obwohl man auch zu der Annahme neigen könnte, daß ein so verwickelt konstruiertes System wie die Proteinsynthese von einer einmal gegebenen Grundform nicht viel abweichen dürfte.

Bedampfungen mit Wolfram wurden von Hart (1965) und Bassel (1969) für das 50 S und von Vasiliev (1971) für das 70 S durchgeführt. Diese Autoren glaubten, Feinstrukturen innerhalb der Partikelkonturen zu erkennen, die sich deutlich vom Untergrund des elektronenmikroskopischen Bildes unterscheiden. Hart (1965) zeigte auch ein Drahtmodell für das 50 S Partikel. Strukturaufklärung in dieser Richtung brachte dennoch keine weiter verwertbare Information, und derartige Modellkonstruktionen wurden auch nicht weiterverfolgt.

Positivkontrast wurde häufig für Polysomen (Slayter et al., 1963, Matthias et al., 1964) angewendet, um den RNS-Faden sichtbar zu machen. Außer einer Arbeit (Florendo, 1969), in der die Ribosomenstruktur in intakten Mausleberzellen durch Ultradünnschnitte untersucht wurde, gab der Positivkontrast keine Information über interne Struktur oder genaue Umrisse (Shelton et al., 1966; Amelunxen, 1971 a; Bladen, 1965). Florendo's Arbeit zeigte ähnlich gut aufgelöste 80 S Bilder, wie sie im Negativkontrast erreicht werden, wobei auch das 40 S Partikel ähnlich dem in vorliegender Arbeit beschriebenen 30 S Partikel gefunden wurde.

Andere Informationen aus positiv kontrastierten Partikeln wie "Fenster" im 70 S Partikel der Arbeit von Huxley et al. (1960) und die sichtbar-

machung eines RNS-Fadennetzwerks (Nanninga, 1967) erscheinen aufgrund des ähnlichen Bildhintergrunds zweifelhaft. Auch Struktur und Formation von Ribosomenkristallen aus Hühnerembryonen wurden im Positivkontrast untersucht (Byers, 1967). Dabei wurde aber mehr Wert auf die Formation gelegt, was der Positivkontrast natürlich möglich macht.

Negativkontrast wurde von den meisten Autoren benützt. Die erste ausführliche Arbeit über 50 S und 70 S (Huxley, 1960) zeigte das 50 S als rundliches Partikel und das 70 S Partikel als Ellipsoid mit geringen Achslängenunterschieden und einem Einschnitt, der im Bild das 50 S vom 30 S teilt.

Feinere Strukturumrisse, doch im wesentlichen die gleichen Bilder für das 70 S zeigen die Arbeiten von Shelton et al. (1966) und Miller et al. (1966) und Bruskov et al. (1968). Die Arbeit von Lubin (1968) über das 50 S brachte ein Modell, das aufgrund von drei reproduzierbaren Formen aufgestellt wurde. Wenngleich das Modell sehr zweifelhaft bleibt, weil andere reproduzierbare Formen, die einerseits in jener Arbeit und andererseits in vorliegender Arbeit gefunden wurden, schwer in das Modell einzupassen sind, wurde von Lubin doch gezeigt, daß es reproduzierbare Formen gibt.

Zwei Arbeiten von Bruskov et al. (1968 a, b) interpretieren die 50 S Formen als Tunnel. In diesen Arbeiten stehen die ausgewählten Bilder in einem schlechten Verhältnis zum Übersichtsbild, das nur in einer Arbeit gegeben wurde. In der Arbeit von Nanninga (1968) wurden zum Teil fünfeckähnliche Formen gefunden, als Feinstruktur wurden zentrale

Ringe am 50 S beschrieben. Neuere Aufnahmen von Nanninga (persönliche Mitteilung) decken sich in den Erscheinungsformen der 50 S mit denen der vorliegenden Arbeit. Negativkontrastierung wurde in einer Studie über Polysomen (Matthias et al., 1964) verwendet, die aber keine Information zur Struktur der ribosomalen Untereinheiten oder zum Bindungs-ort der Messenger RNS brachte.

Negativkontrastierung wurde zur Identifizierung von rekonstituierten 30 S Partikel von Samarina et al. (1967) verwendet, ebenso in der Arbeit von Sabatini et al. (1966) über Ribosomen, die an der microsomalen Membran anhaften.

Felstruktur, die die Proteinfäden nachzeichnen soll, wurde von Funakoshi et al. (1971) für 80 S Ribosomen beschrieben. Eine ausführliche Studie über 80 S Leberribosomen (Nonomura et al., 1971) brachte ein Modell sowohl für die Untereinheiten als auch für das komplette Ribosom. Kippen im Elektronenmikroskop wurde zur Stützung des Modells für die 80 S Ribosomen unternommen. Die größere Untereinheit (60 S) wird dabei etwa als Halbkugel mit einer Rille auf der planen Seite angenommen. Die Rille teilt den Flächendurchmesser im Verhältnis 1 : 2. Die kleinere Untereinheit, das 40 S, ein Ellipsoid mit einem Einschnitt quer zur Längsachse im Verhältnis 1 : 2, tritt mit dem 60 S zum 80 S derart zusammen, daß es aufgrund seiner Dimensionen die Hälfte des planen Teils des 60 S abdeckt. Die Einschnitte des 40 S und des 60 S kommen dabei aufeinander zu liegen, so daß ein Tunnel gebildet wird. Dabei wird spekuliert, daß dies die Führungsrille für die Messenger RNS ist, eine Spekulation, die durch vorläufige eigene Ergebnisse - Bilder von poly U inkubierten 30 S

E. coli Partikeln - plausibel erscheint. Ein vollständiges dreidimensionales Modell für mitochondriale 70 S Ribosomen wurde bisher nur in einer Arbeit vorgestellt (Vignais et al., 1972). Dieses Modell ist jedoch durch die gezeigten Bilder nur mangelhaft gestützt.

3.4 30 S Untereinheit

Die 30 S Untereinheit erscheint auf negativ kontrastierten Präparaten einheitlich in Größe und Form (Fig. 13). Von 100 wahllos herausgegriffenen Partikeln der Fig. 14 haben 54 eine Länge zwischen 180 und 200 Å, und 96 eine Länge zwischen 175 und 205 Å. Die Breite der Partikel wurde nicht gemessen, weil die Partikel in verschiedenen Lagen entsprechend verschiedenen Drehungen um ihre Längsachse auf dem Gitter liegen. Die Form der 30 S Untereinheit ähnelt der Form, die für die 40 S Untereinheit der Ribosomen von Rattenleber (Nonomura et al., 1971) vorgeschlagen wurde, ein Ellipsoid mit einer Teilung senkrecht zur Längsachse im Verhältnis 1 : 2. Eine hantelförmige Gestalt wurde für die 40 S Untereinheit von *Pisum sativum* präsentiert (Amelunxen, 1971 b).

Die 30 S Untereinheiten liegen immer der Länge nach auf dem Trägerfilm. In Fig. 17 sind fünf verschiedene Formtypen gezeigt, denen der größte Teil der gefundenen Partikel angehört. Die Bilder der ersten Reihe wurden mit dem Goniometer aufgenommen (Objektivlinsen mit Goniometer erreichen geringere Auflösung), die Bilder der zweiten Reihe mit dem normalen Objektiv. Diese sind Fotos von Trägerfilmbereichen, auf denen die Verteilung des Negativkontrastmittels nicht sehr gleichmäßig war. Unter solchen Bedingungen erscheint die Gestalt der Partikel weniger gut definiert (siehe 3.2).

Hauptsächlich kann man zwei Formen unterscheiden: Partikelbilder mit "Haken" und solche ohne "Haken" (Fig. 16b,d und 16,a,c), wodurch der jeweilige Bildtyp charakterisiert wird. Was als Haken im Bild erscheint, kann auch eine Furche im Partikel sein, die mit Uranylacetat gefüllt ist. Der Haken zeigt auf den Bildern immer nach rechts. Dieser Effekt wird durch spezifische Adsorption auf dem Kohlefilm erklärt. Er wurde auch für 80 S Leberribosomen (Nonomura et al., 1971) gefunden. Die Aufnahme der Fig. 13 stammt von einem "Filmsandwich" (siehe Methode), daher sind Links- und Rechts-Bilder mit der gleichen Häufigkeit vertreten.

Bilder mit Haken und solche ohne Haken sind verschiedene Ansichten identischer Partikel, die mit verschiedenen Orientierungen auf dem Trägerfilm liegen. Zur Bestätigung wurden Präparate bezüglich des Elektronenstrahls um definierte Winkel gekippt. Eine Aufnahme bei 0° Goniometerstellung zeigt Fig. 18. Aufnahmen gekippter 30 S Präparate sind in Fig. 19 gezeigt. Partikel, deren Längsachse mit der Kippachse zusammenfiel, wurden ausgewählt. Es wurde versucht, die verschiedenen Formtypen den Typen der Fig. 17 zuzuordnen. Bilder, die sich nicht eindeutig zuordnen ließen, tragen zwei Nummern. Im Wesentlichen zeigen die Kippexperimente, daß Bilder mit Haken in solche ohne Haken übergeführt werden können und umgekehrt.

Dimere von 30 S können bei Magnesiumkonzentrationen über 10 mM auftreten (C. Gualerzi, persönliche Mitteilung). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß im Dimer stets die Seiten mit dem Haken einander zugewandt, bzw. die gebogenen Rückenkonturen nach außen gerichtet sind (Fig. 20).

Auch die Dimere zeigen die oben beschriebene spezifische Orientierung der Haken, d.h. Spiegelbilder des Dimerentyps in Fig. 20 werden nicht gefunden. Bei diesen Präparationen wurde nicht die Doppelschichttechnik verwendet. Im Dimer der Fig. 20 b 4 ist eine Komponente gedreht. Bild 20 b 3 zeigt einen Fall der Bindung analog zu derjenigen in den 100 S Partikeln (70 S Dimere) von Huxley (1960). In den 70 S Dimeren ist die im 30 S Dimer bevorzugt auftretende Bindungsfläche durch das 50 S abgedeckt, die 70 S dimerisieren an der gekrümmten 30 S Kontur. Die Dimere der Figur 20-b 3 und 20-b 4 treten äußerst selten auf. Die Vermutung liegt nahe, daß die Partikelseite mit dem Haken die dem 50 S zugewandte ist, wenn ein komplettes 70 S vorliegt, d.h. die Grenzfläche zwischen den Untereinheiten darstellt. Diese Vermutung wird durch zwei Ergebnisse gestützt: Dimere zeigen kaum Bindungsfähigkeit für den Dissoziationsfaktor f_3 , wobei f_3 wahrscheinlich an der Grenzfläche bindet (C. Gualerzi, persönliche Mitteilung). Das heißt, daß die Bindungsstellen im Dimeren wahrscheinlich abgedeckt sind. Daraus wird geschlossen, daß die im Dimer einander zugewandten Seiten im 70 S die Grenzfläche zum 50 S bilden. Zudem erscheint in den in dieser Arbeit gezeigten Aufnahmen die Form des isolierten 30 S gleich der des im 70 S gebundenen, wie es in der Literatur beschrieben wurde. Sowohl im Verband mit dem 50 S wie auch mit einem weiteren 30 S zum Dimer zeigt die gekrümmte Kontur nach außen.

3.5 Diskussion

Die meisten Arbeiten über die 30 S Untereinheit beschrieben die Partikel, wenn diese mit dem 50 S Partikel zum 70 S vereinigt war. Bei isolierten Partikeln konnten kaum regelmäßige Formen erkannt werden. Es konnte nicht entschieden werden, ob dies mit funktionaler Heterogenität oder mit Präparationsschwierigkeiten zusammenhängt. Dazu soll angemerkt werden, daß in der vorliegenden Arbeit sowohl NH_4Cl gewaschene wie auch nicht gewaschene 30 S Untereinheiten die gleichen Formen zeigen. Kombiniert mit dem 50 S jedenfalls wurde die 30 S Untereinheit als flaches oder längliches Partikel (Hall et al., 1959; Lubin, 1968) beschrieben, einem Telefonhörer ähnlich (Vasiliev, 1971), bipartit (Shelton et al., 1966;

Miller et al., 1966; Vasiliev, 1971), tripartit (Shelton et al. 1966; Miller et al., 1966). Als bipartit wurde die 30 S Untereinheit aufgrund von wenigen ausgewählten Bildern bereits 1964 beschrieben (Matthaei et al., 1964). Die einzige Arbeit, die sich ausführlich mit isolierten 30 S Partikeln befaßt, ist die von Amelunxen (1971 a): Es wurden zwei verschiedene Partikelformen gefunden, die als Stäbchen und Scheibchen bezeichnet wurden. Innerhalb dieser Stäbchen und Scheibchen gab es jedoch immer noch starke Formvariationen. Der Prozentsatz an Partikeln der Scheibchenform vergrößerte sich in Sedimentationspräparaten. So scheint es möglich, daß die Scheibchenform aus der Stäbchenform entstanden ist, wenn das Stäbchen senkrecht zur kurzen Achse auf das Trägernetz auftrifft und mechanisch verformt wird, was umso häufiger passieren wird, je stärker die Kräfte einwirken (Zentrifugation).

Außerdem waren die Präparationen positiv kontrastiert, in 2 % Uranylacetat, pH 4.4 über Nacht, eine Prozedur, die eine Desintegration des 30 S Partikels zur Folge hat (E. Schwabe, persönliche Mitteilung).

Positivkontrastierung ist überhaupt keine glückliche Wahl für das Studium von Ribosomen. Ribosomen sind stark hydratisierte Partikel. Im Vakuum des Elektronenmikroskops kann daher beim Trocknungsprozeß die Struktur zusammenbrechen und dann undefinierte Formen zeigen. Der Negativkontrast kann eher die Form von hydratisierten Partikeln erhalten, weil sich um das Partikel eine Kontrastmittelschicht legt, die schneller auskristallisiert als das Partikel dehydratisiert und damit die einzementierte ursprüngliche Form wiedergeben kann.

Die Kerbe im 30 S Partikel kann nicht als eine lokale Anhäufung von Uranylionen, hervorgerufen durch eine lokale hohe Konzentration von RNS, interpretiert werden, da positiv gefärbte Partikel eine gleichmäßige Kontrastmittelverteilung über das ganze Partikel zeigten.

Die Absolut-Messungen der Partikelgröße hängen von der Definition ab, welcher Kontrastwert als Anfang des Teilchens gilt und von der Genauigkeit des Eichgitters, das für die Bestimmung der elektronenoptischen Vergrößerung verwendet wird. Für die in 3.4 gezeigte Einheitlichkeit der Länge der Partikel ist dieses Argument jedoch nicht von Bedeutung. Die Daten für die Ausdehnung entlang der Längsachse stimmen mit denen aus Röntgenkleinwinkelstreuung berechneten überein (HILL, 1969), die einen Wert von $220 \text{ \AA}$ ergaben. Allerdings wurde in jener Studie ein Ellipsoid mit den Abmessungen $220 \times 220 \times 55 \text{ \AA}$ vorgeschlagen, Werten, die nicht mit der allgemeinen Form der 30 S Untereinheit, beschrieben

in dieser Arbeit, übereinstimmen.

Modell für die 30 S Untereinheit - Diskussion der Aufnahmen gekippter Präparate

Modellkonstruktionen für Ribosomen wurden oft aufgrund von zwei oder drei ausgewählten Partikelbildtypen erstellt. Diese sollten durch Rotation um jeweils 90° ineinander übergeführt werden können. Eine Hauptschwierigkeit solcher Modellkonstruktionen liegt in der Auswahl der "richtigen" Partikelbilder. Die Verschiedenheit der Bildtypen kann einmal von der verschiedenen Lage der Partikel auf dem Trägerfilm, zum anderen von der Kontrastmittelverteilung herrühren. Zum Beispiel hängt es von der gebundenen Kontrastmittelmenge ab, ob die dem Film zu- bzw. abgewandten Partikelseiten gleichermaßen zur Abbildung des Teilchens beitragen (Klug et al., 1964).

Negativkontrastierung von Partikeln erzeugt eine Kontrastansammlung in einer Schicht parallel zum Trägerfilm. Dadurch werden die zum Trägerfilm parallel liegenden Partikelumrisse bevorzugt abgebildet. Präparatkipfung im Elektronenmikroskop bedeutet daher nur eine Kippung der unveränderten Ansammlung des Kontrastmittels. Eine Abbildung dieser gekippten Kontrastmittelsammlung führt daher im Wesentlichen zu einer Bildverkürzung im Vergleich zur Abbildung des ungekippten Präparates, und nicht zu einer neuen Ansicht des Partikels.

Sind dagegen hervortretende Strukturdetails des Partikels in der Kontrastmittelschicht vorhanden, so kann die Änderung dieser Details im Bild durch Kippen sehr wohl verfolgt werden. Ein

Strukturdetail wird nur dadurch sichtbar, daß es eine eigene Kontrastmittelverteilung zusätzlich zu der des Gesamtpartikels erzeugt. Durch Kippen können die Intensitätsmaxima des Gesamtkontrastes zusammenfallen, wodurch das Detail im Bild verschwindet. Dieser Vorgang ist einer Drehung des Modells ungefähr äquivalent, wenngleich der am Goniometer abgelesene Winkelbetrag mit dem der Modelldrehung zur Erzeugung desselben Bildes nicht übereinstimmen muß. Beim Drehen des Modells nämlich werden Konturen relativ zueinander verschoben, d.h. bei einem definierten Winkel verdeckt eine Kontur die andere, während beim Kippen der Kontrastansammlungen Intensitätsverteilungen überlagert werden. Intensitätsverteilungen aber können in Abhängigkeit von der Kontrastmittelansammlung bei identischer Partikelposition variieren.

Aus den eben diskutierten Gründen ist es zu verstehen, daß Kippen von negativ gefärbten Viruspartikeln auch bei einem Winkel von 2° zu einer signifikanten Bildveränderung führt und damit eindeutige Information zum Erstellen eines Modells geben kann (Klug et al., 1968). Die Viruspartikel haben hohe Symmetrie und gut erkennbare Untereinheiten, an deren Überlagerungsmuster ein Modell geprüft werden kann. Im Gegensatz dazu konnten verschiedene Bildtypen des 50 S Partikels durch Kippen nicht korreliert werden (siehe Kapitel 3.1). Beim Kippen von 30 S Präparaten wurde das Strukturdetail "Haken" am 30 S verfolgt.

Die zwei hauptsächlich auftretenden Bildtypen (Fig. 16a,c bzw. Fig. 16b,d) konnten ineinander übergeführt werden. Es wurde ein vorläufiges Modell für das 30 S Partikel erstellt: Fig. 21 zeigt eine schräg liegende Furche im Partikel. Diese Furche erzeugt das Bild mit dem Haken im Elektronenmikroskop. Wie erwähnt, zeigt der Haken immer nach rechts. Dies ist im Bild dann der Fall, wenn die dem Betrachter zugewandte Seite der Fig. 21 a auf den

Trägerfilm zu liegen kommt, wie in Fig. 21 c gezeigt. Drehung des Modells in der Ansicht von Fig. 21 a nach rechts um 90° gibt die Ansicht der Fig. 21 d. Fig. 21 b und 21 d würden im Elektronenmikroskop ähnliche Bilder geben (Fig. 17-1, 17-2). Eine Verfeinerung des Modells ist vorläufig nicht möglich.

4. Verwendung von Antikörpern zur Markierung in der Elektronenmikroskopie

Antikörper wurden schon früh in der Mikroskopie als Markierungssubstanz intrazellulärer Antigene verwendet. Zur Sichtbarmachung der Antikörper wurde für die Lichtmikroskopie Fluoreszenzstoffe angekoppelt, weil die Auflösung des Lichtmikroskops über der Größe der Antikörper liegt. Das Elektronenmikroskop mit seiner heute garantierten Punktauflösung von $5 \text{ \AA}$ könnte einen Antikörper leicht abbilden. Dem steht die geringe Dichte des Proteins bezüglich der Streuung von Elektronen entgegen, die im Falle der flachen Antikörperstruktur auch durch Kontrastmittel bisher nicht vergrößert werden konnte. So wurde analog zur Lichtmikroskopie versucht, elektronendichte Moleküle an den Antikörper zu hängen (Singer, 1959; Rifkind et al., 1960; Morgan et al., 1961). Zum Beispiel wird Ferritin mittels bivalenter chemischer Reagentien (Kind et al., 1972) an den Antikörper gekoppelt, statt Ferritin können aber auch Viren oder leicht zu identifizierende Enzyme, die gewöhnlich dicht gepackt sind, verwendet werden. Der Nachteil dieser Methode ist, daß der Antikörper einen Teil seiner antigenen Wirkung, sowie als Gesamtkomplex auch teilweise seine

Spezifizität einbüßt: Das Ferritin wird natürlich nicht nur an das nicht bindende Fc Fragment des Antikörpers, sondern auch an die bindenden Fab Fragmente gebunden. Die Spezifizität geht teilweise verloren, weil Ferritin als stark negativ geladenes Molekül sich unspezifisch etwa an Membranstrukturen festsetzt. Der erste Nachteil kann durch Herstellen hybrider Antikörper beseitigt werden. Diese tragen zwei Spezifitäten, zum Beispiel eine gegen das zu untersuchende Antigen, die andere gegen Ferritin.

Es wurde vorgeschlagen, für die Elektronenmikroskopie Antikörper zu verwenden, die nach Thiollisierung mit Homocystein Thiolacton stark mit Methylquecksilber markiert worden sind (Kendall, 1972). Die Antikörper behielten nach dieser Reaktion teilweise ihre Antigenizität. Doch bisher wurde dieses Verfahren für die Elektronenmikroskopie noch nicht ausgetestet.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, den Antikörper direkt sichtbar zu machen

Antigen-Antikörper-Komplexe wurden in der Elektronenmikroskopie eingehend studiert. Erste Arbeiten (Easty et al., 1958; Almeida et al., 1963; Lafferty et al., 1963; Elek et al., 1964; Giesbrecht, 1964; Robinson,

1966; Svehag et al., 1967a) benutzten Viren, Bakteriengelbsteine oder Ferritin als Antigen, also gut definierte und bekannte Objekte. Trotzdem konnte über die Gestalt der Antikörper kaum mehr ausgesagt werden, als daß sie fädig (Giesbrecht, 1964) erscheinen. Auch konnte der Verlauf eines einzelnen Antikörpers nicht im Bild verfolgt werden.

Heute besteht einigermaßen Klarheit über die dreidimensionale Struktur der Antikörper. Es gibt zwei Hauptklassen, IgG und IgM. Für die IgM Klasse wurde eine spinnenartige Struktur mit fünf Beinen vorgeschlagen (Svehag et al., 1967b; Chesebro et al., 1968; Feinstein et al., 1969, Bloth et al., 1968). Die IgG Klasse ist chemisch gut definiert. Man weiß, daß das Molekül aus zwei leichten und zwei schweren Proteinketten von oft bekannter Sequenz besteht, die durch Sulfidbrücken zusammengehalten werden. Durch Enzyme kann das Molekül in drei Teile gespalten werden: in zwei, die das Antigen binden (Fab = fragment antigen binding) und in eines, das nicht bindet (Fc = fragment crystallizable). Durch Reduktion kann der Antikörper in zwei äquivalente Hälften gespalten werden. Diese Befunde legen eine Y- oder T-förmige Gestalt des IgG Moleküls nahe.

Ein V-förmiges Molekül mit einem Scharnier wurde von Feinstein et al. (1965) vorgeschlagen. Ein Y-förmiges Modell leitete Valentine (1967) aus Antikörper-Hapten-Komplexen ab. Aus den Bildern ist auch ersichtlich, daß die Fab-Arme in verschiedenem Winkel zueinander stehen können, ein Befund, der durch Studien von Yguerabide et al. (1970) bestätigt wurde, durch Fluoreszenz-Polarisationsmessungen an ähnlichen Antikörpern (IgA) jedoch nicht bestätigt werden konnte (Weltman et al., 1970). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von IgG Kristallen (Labaw et al.,

1971) zeigten dieselbe Gestalt wie das Modell von Sarma et al. (1971), basierend auf Röntgenstrukturanalyse mit 6 Å Auflösung. Dieses Modell ist in Fig. 22 gezeigt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Struktur des IgG Moleküls für die vorliegende Arbeit hinreichend bekannt ist, daß es aber noch keine elektronenmikroskopische Arbeit gibt, in der das IgG Molekül in definierter Form mit dem Antigen gebunden gezeigt wird. Bei der vorliegenden Arbeit kommt noch erschwerend hinzu, daß die Gestalt der Ribosomenpartikel eine nicht so gut definierte ist wie die von Viren oder Ferritinmolekülen. Einen Vorteil gegenüber den anderen Antigen-Antikörper-Komplex-Studien bietet die Tatsache, daß meist nur ein einziger Antikörper zwei das Antigen tragende Partikel verbindet (siehe Kapitel 5), was das elektronenmikroskopische Bild sehr vereinfacht.

5. Lokalisierung von ribosomalen Proteinen der 50 S Untereinheit

Fig. 24 zeigt eine Kontrollpräparation mit Non-Immun-Serum IgG Antikörpern. Im Trennungsprofil der Sepharosesäule fehlte bereits der Dimerenpeak und die 50 S Partikel zeigten im Elektronenmikroskop die gleiche zufällige Verteilung wie die nicht mit Antikörpern versetzten 50 S Partikel sowie die STNV Viruspartikel der Figur 23. Es kommen in beiden Bildern einige Dimere vor, meistens jedoch Monomere. Dagegen zeigen die mit spezifischen Antikörpern reagierten 50 S Präparationen zumeist Dimere oder höhere Aggregate (Fig. 26,27,28,29).

In Präparationen mit Antikörpern gegen Proteine, die auf dem Ribosom öfter als einmal vorkommen, wie L 7 und L 12 (L 7 und L 12 sind chemisch nahezu und immunologisch völlig identische Proteine; Kaltschmidt et al. (1970b), Stöffler et al. (1971), Terhorst et al. (1972)) sollte ein Ribosomen-Antikörper-Netzwerk gebildet werden, da beide Partikel (Antikörper und Ribosomen) in diesem Fall zwei Valenzen - die Ribosomen eventuell mehr - haben. Solche Netzwerke zeigt Fig. 26. Eine graphische Erklärung gibt Fig. 30a.

In Präparationen mit Antikörpern gegen Proteine, die auf dem Ribosom nur einmal vorkommen (wie L 1, L 19 und L 27) sollten hauptsächlich Dimere gefunden werden (schematisch in Fig. 30 b). Dies gilt für die Annahme, daß das Ende des Fab-Teiles, das für die Bindung verantwortlich ist, nach der Bindung an eine Determinante des jeweiligen Proteins alle anderen Determinanten desselben Proteins am Reagieren mit weiteren Antikörpern sterisch hindert. Diese Annahme ist plausibel, wenn man die Dimensionen eines IgG Moleküls (Fig. 22) mit denen der ribosomalen Proteine vergleicht: die ribosomalen Proteine haben Durchmesser von 15 bis 25 Å, geschätzt aufgrund der Röntgenstrukturanalyse kristallisierter Proteine und unter der Annahme, daß sie globulär sind (Paradies, persönliche Mitteilung). Unter der Annahme eines mittleren Molekulargewichts von 20.000 wurde der Durchmesser auf etwa 35 Å geschätzt (Kurland, 1972). Jedoch findet man auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen auch höhere Aggregationen, besonders auf denen mit Anti-L 1 (Fig. 28). Das hat seinen Grund entweder darin, daß ein Reagieren mit einem zweiten Antikörper am selben Ribosom nicht vollständig sterisch verhindert wird

(die Proteine müssen nicht globulär auftreten), oder daß das saure F_C Fragment des Antikörpers unspezifisch mit den basischen Proteinen des Ribosoms reagiert. Letzterer Grund ist weniger wahrscheinlich, weil Aggregationstendenzen bei Bildern mit Anti-L19 und Anti-L27 nicht auftreten (Fig. 27,29).

Die Lokalisierung der Proteine kann nur an definierten und als reproduzierbar erkannten Partikelformen vorgenommen werden. In dieser Arbeit waren es die in Fig. 25 nachgezeichneten, die bereits früher beschrieben wurden.

Man hat also eine Auswahl unter denjenigen Dimerenbildern zu treffen, in denen wenigstens eine 50 S Form mit einer der beiden in Fig. 25 angegebenen übereinstimmt. Die 50 S Partikel sollen nun an eindeutigen Stellen dieser definierten Formen durch einen Antikörper zu Dimeren verbunden werden, für verschiedene Antikörper an verschiedenen Stellen. Diese Stellen sind die Positionen der Proteindeterminanten an der Oberfläche des Ribosoms. Am günstigsten ist es für die Lokalisierung, wenn der Antikörper direkt sichtbar ist und in seiner vollen Gestalt als dreiblättriges Kleeblatt abgebildet wird (siehe die ersten drei Bilder der Anti-L1 Serie - Fig. 31 - in denen zwei 50 S durch ein Y zusammengehalten werden, und das letzte Bild, auf dem ein Antikörper auf einem Monomeren sitzt, weiterhin die Serie Anti-L19 - Fig. 32 - erste drei Bilder). Man kann aber nicht erwarten, daß der Antikörper immer deutlich sichtbar wird.

Wenn der Antikörper derart über dem Kohlefilm zu liegen kommt, daß das Kontrastmittel ihn nicht erreicht, wird er nicht abgebildet. Eine zu

dicke Kontrastmittelschicht kann bei der geringen Dicke eines Antikörpers ein schlechtes Signal-Rausch-Verhältnis geben. Der Antikörper kann auch zwischen beiden Ribosomenpartikeln verdeckt liegen, oder er liegt nicht parallel zum Gitter, was ebenso die Sichtbarmachung verhindert. In solchen Fällen kann die Position des Proteins aus der Stellung der Dimere zueinander ersehen werden.

Wichtig dabei ist, daß eine bestimmte Dimerenkombination nur bei Präparationen mit Antikörpern gegen das gleiche Protein auftritt. (außer die Proteine liegen eng benachbart).

Bei der vorliegenden Arbeit wurde so vorgegangen, daß eine mit dem erwarteten Ergebnis nicht vertraute Person auf Bildern der Anti-L27 Präparationen nach Dimerenkombinationen des Typs der Anti-L19 Präparationen suchte, analog für L1.

Ein weiteres Kriterium für die Spezifität ergibt sich aus den Symmetrieeigenschaften der IgG-Moleküle: Ein IgG Antikörper hat eine zweizählige Rotationssymmetrieachse entlang der Längsachse des Fc Teils (Fig. 22). Daher sind spiegelsymmetrische Formkombinationen wie in Fig. 34 nicht möglich, außer die Fab-Arme können um 180° rotieren, beide Lagen der 50 S Partikel, in der Fig. 35 schematisch dargestellt, werden identisch abgebildet, oder zwei Partikel kommen aufgrund der "sandwich"Technik nebeneinander zu liegen und geben Spiegelbildsymmetrie.

Nur der rotationssymmetrische Typ von Dimerenkombinationen wird gefunden (Fig. 36). Selbst bei so extremer Lage des Partikels links: Im Bild der zweiten Reihe der Fig. 31 "klappt" der Fab-Arm nicht um, um ein spiegelsymmetrisches Bild zu erzeugen. Es bleibt noch die Möglichkeit, daß gerade die spiegelsymmetrischen Dimeren undefinierbare Bilder ergaben, und daher als

solche nicht erkannt werden konnten. Das hätte jedoch auf die Richtigkeit der Auswahl der Dimere keinen Einfluß. Der Dimerenkomplex kann natürlich in Doppelschichtpräparaten in beiden spiegelsymmetrischen Konfigurationen auftreten.

Die Ergebnisse der Proteinlokalisierung sind aus den Fig. 31, 32, 33 ersichtlich. Schematisch sind sie in Fig. 36 zusammengefaßt.

Demnach liegt Protein L1 in der Kronenform des 50 S Partikels an der einen oberen Außenzacke (die zumelst kleiner ausgebildet ist als die andere äußere Zacke), das Protein L19 auf der planen Seite der Halbkreisform unterhalb der Kerbe (wenn wie in Fig. 25 gesehen), das Protein L27 auf der runden Seite der Halbkreisform, etwa gegenüber der Kerbe in der planen Seite.

Bei Dimeren, die nicht rotationssymmetrisch im Bild erscheinen, kann, sofern eine 50 S Form klar definiert ist, die antigene Determinante auf der noch undefinierten Form auch bestimmt werden. Dadurch können die zweidimensionalen Bilder grob gesehen zueinander in Beziehung gebracht werden. Beispiele für diese Möglichkeit gibt die dritte Reihe der Fig. 32 und das letzte Bild der dritten Reihe der Fig. 33. Eine vollständige Topographie der ribosomalen Proteine erscheint auf diese Weise möglich.

6. Literaturverzeichnis

Amelunxen, F.: Investigations on the structure of ribosomes.

A contribution to the conformation of ribosomes, especially of the 30 S subunit. *Cytobiologie* (1971a)3, 111-126

Amelunxen, F., and E. Spiess: Investigations on the structure of ribosomes. A contribution to the conformation of the 80 S ribosomes from *Pisum sativum*. *Cytobiologie* (1971b)4, 293-306

Almeida, J., B. Cinader, and A. Mowatson: The structure of antigen-antibody complexes. A study by electron microscopy. *J. Exptl. Med.* (1963) 118, 327-340

Bassel, A., and L.L. Campbell: Surface structure of *Bacillus stearothermophilus* ribosomes. *J. Bacteriology* (1969) 98, 811-815

Bladen, H.A., R. Byrne, J.G. Levin, and M.W. Nirenberg: An electron microscopic study of a DNA-ribosome complex formed in vitro. *J. Mol. Biol.* (1965) 11, 78-83

Bloth, B., B. Chesebro, and S. Svehag: Ultrastructural studies of human and rabbit α M-Globulins. *J. Exptl. Med.* (1968) 127, 749-756

Bruskov, V.I., and N.A. Kiselev: Electron microscope study of the structure of *Escherichia coli* ribosomes and CM-like Particles. *J. Mol. Biol.* (1968) 37, 367-377

Bruskov, V.I., and N.A. Kiselev: Electron microscopy investigation of the structure of cytoplasmatic ribosomes of bean leaves. J. Mol. Biol. (1968) 38, 443-445

Byers, B.: Structure and formation of ribosome crystals in hypothermic chick embryo cells. J. Mol. Biol. (1967) 26, 155-167

Chesebro, B., B. Bloth, and S.-E. Svehag: The ultrastructure of normal and pathological IgM Immunoglobulins. J. Exp. Med. (1968) 127, 399-410

Dzionara, M., E. Kaltschmidt, and M.G. Wittmann: Ribosomal proteins. XIII. Molecular weights of isolated proteins of E. coli. Proc. Natl. Acad. Sci. (1970) 67, 1909-1913

Easty, G.C., and E.H. Mercer: Electron microscopic studies of the antigen-antibody complex. Immunology (1959) 1, 353-364

Elek, S.B., B.V. Kingsley Smith and W. Highman: The interaction of antigen and antibody in agglutination. Immunology (1964) 7, 570-585

Feinstein, A., and A.J. Rowe: Molecular mechanism of formation of an antigen-antibody complex. Nature (1965) 205, 147-149

Feinstein, A., and E.A. Munn: Conformation of the free and antigen bound IgM antibody molecules. Nature (1969) 224, 1307-1309

Florendo, N.T.: Ribosome substructure in intact mouse liver cells.

J. Cell Biol. (1969) 41, 335-339

Funakoshi, H., and K. Iso: Characteristic patterns observed in electron microscopic photos of negatively stained yeast 80 S ribosomes.

J. Biochem. (1971) 70, 201-204

Gesteland, R.F.: Unfolding of E. coli ribosomes by removal of magnesium.

J. Mol. Biol. (1966) 18, 356-371

Giesbrecht, P.: Über den elektronenmikroskopischen Nachweis von Antikörpern gegen Bakterien und ihre Organellen. Zentralbl. f. Bakt.

(1964) 194, 503-525

Gualerzi, C.: nicht veröffentlichte Beobachtungen

Hall, C.E., and H.S. Slayter: Electron microscopy of ribonucleoprotein particles from E. coli. J. Mol. Biol. (1959) 1, 329-332

Hart, R.G.: Surface features of the 50 S ribosomal component of E. coli.

Proc. Natl. Acad. Sci (1965) 53, 1415-1420

Hill, W.E.: X-ray scattering study of ribosomes from E. coli.

J. Mol. Biol. (1969) 44, 89-102

Hill, W.E., J.W. Anderegg, and K.E. van Holde: Effects of solvent environment and mode of preparation on the physical properties of ribosomes from E. coli. J. Mol. Biol. (1970) 53, 107-121

Huxley, H.E., and G. Zubay: Electron microscope observations on the structure of microsomal particles from E. coli. J. Mol. Biol. (1960) 2, 10-18

Kaltschmidt, E., and H.G. Wittmann: Ribosomal proteins. XII. Number of proteins in small and large ribosomal subunits of *Escherichia coli* as determined by two-dimensional gel electrophoresis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1970) 67, 1276-1282

Kaltschmidt, E., M. Dzlonara, and H.G. Wittmann: Ribosomal proteins XV. Amino acid compositions of isolated ribosomal proteins from 30 S and 50 S subunits of *Escherichia coli*. *Molec. Gen. Genetics* (1970) 109, 292-297

Kendall, P.A.: Antibody labelling for electron microscopy: Immunochemical properties of Immunoglobulin G heavily labelled with methyl mercury after thiolation by homocysteine thiolactone. *Biochim. Biophys. Acta* (1972) 257, 101-110

Klug, A., and J.E. Berger: An optical method for the analysis of periodicities in electron micrographs, and some observations on the mechanism of negative straining. *J. Mol. Biol.* (1964) 10, 565-569

Klug, A., and J.T. Finch: Structure of viruses of the Papilloma-Polyoma type. IV. Analysis of tilting experiments in the electron microscope. *J. Mol. Biol.* (1968) 31, 1-12

Kind, J., and J. Krieg: Glutaraldehyd als Kopplungsreagens von Ferritin an Antikörper. Ein Beitrag zur Herstellung und Reinigung ferritinmarkierter Antikörper. *Cytobiologie* (1972) 6, 22-28

Kurland, C.G.: Structure and function of the bacterial ribosome.

Ann. Rev. Biochem. (1972) 41, 377-408

Labaw, L.W., and D.R. Davies: An electron microscopic study of human

G 1 Immunoglobulin crystals. J. Biol. Chem. (1971) 246, 3760-3762

Lafferty, K.J., and S. Oertel: The interaction between virus and

antibody. III. Examination of virus-antibody complexes with the

electron microscope. Virology (1963) 21, 91-99

Lubin, M.: Observations on the shape of the 50 S ribosomal subunit.

Proc. Natl. Acad. Sci. (1968) 61, 1455-1461

Mareš, N., and R. Romani: Ribosomes from fig fruits: Physical

Properties and the occurrence of transient dimers. Biochim. Biophys.

Acta (1971) 247, 280-290

Mathias, A.P., R. Williamson, H.E. Huxley, and S. Page:

Occurrence and function of Polysomes in rabbit reticulocytes.

J. Mol. Biol. (1964) 9, 154-167

Matthaei, H., F. Amelunxen, K. Eckert, and G. Heller: Zum Mechanismus

der Proteinbiosynthese. I. Die Bindung von Matrizen-RNS und Amino-acyl

RNS an Ribosomen. Ber. Bunsenges. physikal. Chemie (1964) 68, 735-742

Miller, A., U. Karlsson, and N.K. Boardman: Electron microscopy of ribosomes isolated from tobacco leaves. J. Mol. Biol. (1966) 17, 487-489

Morgan, C., R.A. Rifkind, K.C. Hsu, M. Holden, B.C. Seegal, and H.M. Rose: Electron microscopic localization of intracellular viral antigen by the use of Ferritin-conjugated antibody. Virology (1961) 14, 292-296

Nanninga, N.: Fine structure observed in 50 S ribosomal subunits of *Bacillus subtilis*. J. Cell. Biol. (1967) 33, C1

Nanninga, N.: The conformation of the 50 S ribosomal subunit of *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. (1968) 61, 614-620

Nanninga, N.: Structural aspects of ribosomes. Int. Rev. of Cytology (1972, in press)

Nisbeth, J.H., and H.S. Slayter: A 44 S particle derived from the 50 S ribosomal subunit of *E. coli* and its polymerization. Biochim. Biophys. Acta (1971) 247, 419-429

Nomura, M., and V.A. Erdmann: Reconstitution of 50 S ribosomal subunits from dissociated molecular components. Nature (1970) 228, 744-748

Nonomura, Y., G. Blobel, and D. Sabatini: Structure of liver ribosomes studied by negative staining. J. Mol. Biol. (1971) 60, 303-323

Rifkind, R.A., K.C. Hsu, C. Morgan, B.C. Seegal, A.W. Knox, and H.M. Rose: Use of Ferritin-conjugated antibody to localize antigen by electron microscopy. *Nature* (1960) 187, 1094-1095

Robinson, J.P.: Electron microscope studies of antigen-antibody complexes. *J. Mol. Biol.* (1966) 17, 456-462

Sabatini, D.D., Y. Tashiro, and G.E. Palade: On the attachment of ribosomes to microsomal membranes. *J. Mol. Biol.* (1966) 19, 503-524

Samarina, O.P., J. Molnar, E.M. Lukanidin, V.I. Bruskov, A.A. Krichevskaya, G.P. Georgiev: Reversible Dissociation of nuclear ribonucleoprotein particles containing m-RNA into RNA and protein. *J. Mol. Biol.* (1967) 27, 187-191

Sarma, V.R., E.W. Silvertown, D.R. Davies, and W.D. Terry: The three-dimensional structure at 6 Å resolution of a human G1 immunoglobulin molecule. *J. Biol. Chem.* (1971) 246, 3753-3759

Shelton, E., and E.L. Kuff: Substructure and configuration of ribosomes isolated from mammalian cells. *J. Mol. Biol.* (1966) 22, 23-31

Singer, S.J.: Preparation of an electron-dense antibody conjugate. *Nature* (1959) 183, 1523-1524

Slayter, H.S., J.R. Warer, A. Rich, and C.E. Hall: The visualization of polyribosomal structure. *J. Mol. Biol.* (1963) 7, 652-657

Stöffler, G., and H.G. Wittmann: Sequence differences of Escherichia coli 30 S ribosomal proteins as determined by immunochemical methods. Proc. Nat. Acad. Sci (1971) 68, 2283-2287

Svehag, S., and B. Bloth: Examination of virus γ M-antibody complexes by electron microscopy. Virology (1967) 31, 676-687

Svehag, S.E., B. Chesebro, and B. Bloth: Ultrastructure of Gamma M Immunoglobulin and Alpha Macroglobulin: electron microscopic study. Science (1967) 158, 933-936

Terhorst, C., W. Möller, R. Laursen, and B. Wittmann-Liebold: Amino acid sequence of a 50 S ribosomal protein involved in both EFG and EFT dependent GTP hydrolysis. FEBS Letters (1972) 28, 325-328

Traub, P., and M. Nomura: Structure and function of E. coli ribosomes. I. Partial fractionation of the functionally active ribosomal proteins and reconstitution of artificial subribosomal particles. J. Mol. Biol. (1968) 34, 575-593

Valentine, R.C.: Electron microscopy of an antibody-hapten complex. J. Mol. Biol. (1967) 27, 615-617

Valentine, R.C., B.M. Shapiro, and E.R. Stadtman: Regulation of Glutamine Synthetase. XII. Electron microscopy of the enzyme from E. coli. Biochemistry (1968) 7, 2143-2152

Vasiliev, V.D.: Electron microscopy study of 70 S ribosomes of *Escherichia coli*. FEBS Letters (1971) 14, 203-205

Vignais, P.V., B.J. Stevens, J. Huet, J. André: Mitoribosomes from *Candida utilis*. Morphological, physical, and chemical characterization of the monomer form and of its subunits. J. Cell. Biol. (1972) 54, 468-492

Voynow, P., and C.G. Kurland: Stoichiometry of the 30 S ribosomal proteins of *E. coli*. Biochemistry (1971) 10, 517-524

Weber, H.J.: Stoichiometric measurements of 30 S and 50 S ribosomal proteins of *E. coli*. Molec. Gen. Genetics (1972), 233-248

Weltman, J.K., and R.P. Davies: Fluorescence polarization study of a human IgA myeloma protein: Absence of segmental flexibility. J. Mol. Biol. (1970) 54, 177-185

Wittmann, H.G., and G. Stöffler: Protein Biosynthesis. L.Bosch (Editor) North Holland Publ. Co. (1972) p.285

Whiting, R.F., and F.P. Ottensmeyer: Heavy atoms in model components and nucleic acids imaged by dark field transmission electron microscopy. J. Mol. Biol. (1972) 67, 173

Yguerabide, J., H.F. Epstein, and L. Stryer: Segmental flexibility in an antibody molecule. J. Mol. Biol. (1970) 51, 573-570

7.1 Nomenklatur ribosomaler Proteine

Die Nomenklatur der Proteine leitet sich vom elektrophoretischen Wanderungsverhalten im zweidimensionalen Gel her, das zur Auftrennung des Proteingemisches benützt wird (Kaltshmidt et al., 1970a). Färbung macht die Gelbereiche sichtbar, in denen sich die jeweiligen Proteine ansammeln. Die Proteinflecke werden zu einem Koordinatensystem in Beziehung gesetzt. Liegt das zweidimensionale Bild derart, daß links die Anode des eindimensionalen Laufs und oben der Probenauftragungspunkt zu liegen kommt, dann werden die Proteinflecken von links nach rechts und in Zeilen von oben nach unten wie beim Ablesen einer Buchseite durchnummeriert. Vor die jeweilige Nummer wird der Buchstabe S (für: "short") für die Proteine der kleinen Untereinheit gesetzt, der Buchstabe L (für: "long") für die Proteine der großen Untereinheit.

7.2 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik unter der Leitung von Herrn Prof. Wittmann durchgeführt.

Herrn Prof. Wittmann danke ich für die großzügige Unterstützung, Herrn Dr. G. Stöffler für die Bereitstellung der benötigten Antikörper, Herrn Dr. R.A. Garrett und Dr. M. Green für einige der Ribosomenpräparationen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Klotz, der in unkonventioneller Weise zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Diskussionen mit Herrn Prof. A. Kleinschmidt, Dr. N. Nanninga, Prof. G. Giesbrecht und das freundliche Entgegenkommen der Mitarbeiter der Abteilung Trautner, in der mir großzügige Arbeitsmöglichkeiten gewährt wurden, waren eine große Hilfe.

7.3 Lebenslauf

Ich wurde am 6.2.1946 als Sohn des Lehrerehepaares Elisabeth und Matthias Wabl in Graz geboren.

Nach vier Jahren Volksschule in Kalsdorf bei Graz absolvierte

Ich acht Jahre Realgymnasium in der B.E.A. Liebenau. Während dieser Zeit war ich vorübergehend Schüler an der Ecole St. Louis

de Gonzague in Paris. Nach der Matura mit Auszeichnung im Jahre 1964

begann ich das Studium der Technischen Chemie an der Technischen

Hochschule Graz, das ich im Juni 1970 als Diplom-Ingenieur mit der

besten Note abschloß. Während meiner Studienzeit in Graz war ich

zeitweise Vorsitzender der liberalen unabhängigen Studentenvereinigung

AKTION und Mandatar der Österreichischen Hochschülerschaft.

Ab Herbst 1970 war ich als Teaching Assistant am Chemistry Department der Boston University, Boston, U.S.A., tätig und studierte dort Molekularbiologie.

Seit dem Wintersemester 1971 bin ich an der Freien Universität im Fachbereich Biologie immatrikuliert. Meine Dissertation begann ich im Juli 1971 am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin. Im Zuge meiner Dissertation arbeitete ich auch an den Universitäten Uppsala und Amsterdam.

Legenden zu den Figuren

Fig. 1 Sepharose 6B Auftrennungsprofil des Gemisches aus 50 S Untereinheiten und Non-Immun-Serum-IgG.

Fig. 2 Sepharose 6B Auftrennungsprofil des Gemisches aus 50 S Untereinheiten und anti-L27 IgG.

Fig. 3 Präparation für die Elektronenmikroskopie: Aufbringen der Probe auf die Trägernetze und Kontrastieren der Präparate.

Fig. 4 Schematische Darstellung des Kippvorgangs:

links: Kippen im Mikroskop

rechts: Kippen der elektronenmikroskopischen Aufnahme

TA: Kippachse

α : Kippwinkel

Fig. 5 50 S Untereinheiten in Puffer A₁, platinbedampft unter einem Winkel von 8° , 120,000 x.

Fig. 6 50 S Untereinheiten in TSM Puffer, negativ kontrastiert mit Uranylacetat, 160,000 x.

Fig. 7 50 S Untereinheiten in Puffer A₂, 120,000 x.

Fig. 8 50 S Untereinheiten in Puffer A₂, 80,000 x.

Fig. 9 Negativ kontrastierte 50 S Untereinheiten, aufgenommen mit dem Goniometer bei 0° .

a) Partikel zeigen vorwiegend fünfeckähnliche Formen, die Kronen ähneln

b) Partikel zeigen vorwiegend Halbkreisformen mit Kerbe
320,000 x.

Fig. 10 Ausgewählte Bilder zweier 50 S Partikelformen, die häufig in Negativkontrastpräparaten anzutreffen sind, 320,000 x.

Fig. 11 Übersichtsbild einer Kippserie von einer 50 S Negativkontrastpräparation. Der Pfeil im Bild des nicht gekippten Präparates (0°) gibt die Richtung der Kippachse an. Das Bild ganz unten (control) zeigt eine gekippte Fotografie.

Die Partikelanhäufung auf den Präparaten kann als Bezugspunkt während des Kippens verwendet werden. Auf den verschiedenen Fotografien können sie dazu benützt werden, identische Partikel aufzusuchen, 270,000 x.

Fig. 12 Kippserien mit 50 S Formen der Figuren 9 und 10. Der Pfeil gibt die Richtung der Kippachse an, 320,000 x.

Fig. 13 Übersichtsbild negativ kontrastierter 30 S Untereinheiten.
Fotografie eines "sandwichs". 270,000 x.

Fig. 14 Übersichtsbild negativ kontrastierter Partikel, Fotografie eines Bereichs von einfacher Kohlefilmschicht. Pfeile zeigen auf Bereiche mit Partikeln von gut definierter Gestalt, 200,000 x.

Fig. 15 Ausschnitte aus Fig. 114, 325,000 x.

Fig. 16 Ausgewählte Partikelbilder:

a und b: dicker Kontrastmittelfilm

c und d: dünner Kontrastmittelfilm

325,000 x.

Fig. 17 Ausgewählte Bilder und schematische Zeichnungen derjenigen Partikelformen, die den Großteil der gefundenen Formen repräsentieren. Die erste Reihe zeigt Bilder, die mit dem Goniometer fotografiert wurden. 400,000 x. Die zweite Reihe zeigt Bilder, die mit normaler Objektivlinse fotografiert wurden. 320,000 x.

Fig. 18 Übersichtsbild der negativ kontrastierten 30 S Präparation, die für die Kippexperimente verwendet wurde. Aufgenommen mit dem Goniometer, 0° . 290,000 x.

Fig. 19 Kippserien von 30 S Untereinheiten. Der Pfeil gibt die Richtung der Kippachse an. Die Ziffern unter den Bildern beziehen sich auf die Klassifizierung der Bilder in Fig. 17.

Fig. 20 30 S Dimere. Kontrastiert mit Uranyl~~oxalat~~oxalat. 400,000 x.

Fig. 21 Vorläufiges Modell der 30 S Untereinheit. Von a nach d ist das Partikel schrittweise um jeweils 90° um die Längsachse gedreht.

Fig. 22 Antikörpermodell nach Sarma et al. (1971)

Fig. 23 STN Virus, negativ kontrastiert. 390,000 x (zur Verfügung gestellt von A. Arnberg).

Fig. 24 50 S Untereinheiten, genommen vom ersten Peak (F 28) des Säulenlaufs, der in Fig. 1 gezeigt ist. Negativ kontrastiert, 390,000 x.

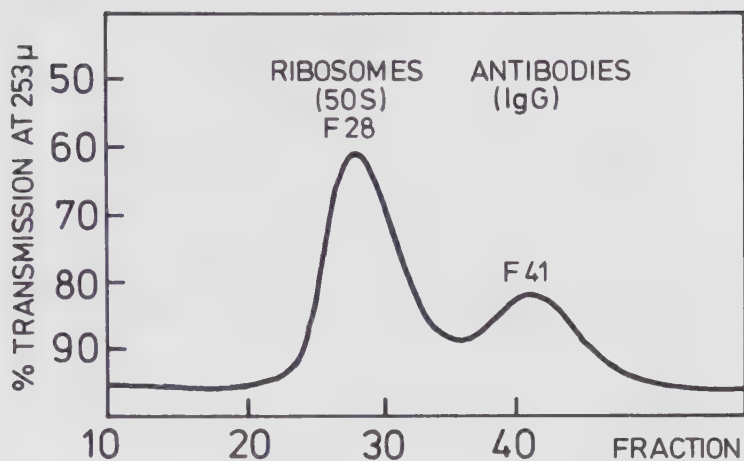
Fig. 25 Zeichnung zweier definierten und reproduzierbaren 50 S Partikelformen.

Fig. 26 Netzwerk bestehend aus 50 S Untereinheiten-Antikörper-Komplexen, entstanden durch Reaktion mit anti-L7 (oder L12). 200,000 x.

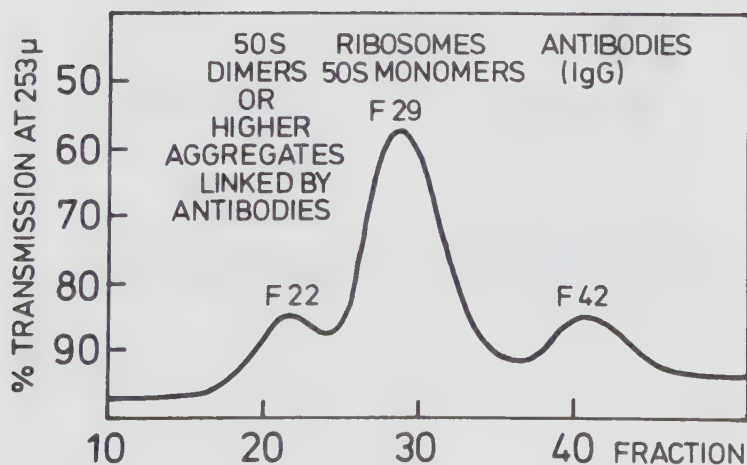
Fig. 27 50 S Untereinheiten, reagiert mit anti-L27. Pfeile zeigen auf die Kerbe der 50 S Untereinheiten um zu zeigen, daß die Kerben immer einander abgewandt sind. 325,000 x.

Fig. 28 50 S Untereinheiten, reagiert mit anti-L1. Pfeile zeigen auf Dimere, an denen die Antikörper deutlich gesehen werden können. 325,000 x.

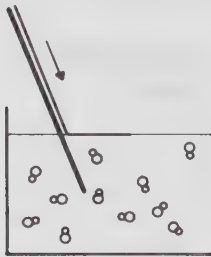
- Fig. 29 50 S Untereinheiten, reagiert mit anti-L19. Pfeile zeigen auf die Kerbe der 50 S Untereinheiten um zu zeigen, daß die Kerben immer einander zugewandt sind. 230,000 x.
- Fig. 30 Schematische Darstellung der Ribosomen-Antikörper Reaktion.
a: für anti-L7 (oder L12)
b: für Antikörper gegen Proteine, die auf dem Ribosom in jeweils nur einem Exemplar auftreten, wie z.B. L27.
- Fig. 31 Ausgewählte Bilder von 50 S Dimeren, erzeugt durch anti-L1. Pfeile zeigen auf Antikörpermoleküle, die die volle Y Gestalt zeigen. 325,000 x.
- Fig. 32 Ausgewählte Bilder von 50 S Dimeren, erzeugt durch anti-L19. 325,000 x.
- Fig. 33 Ausgewählte Bilder von 50 S Dimeren, erzeugt durch anti-L27. 325,000 x.
- Fig. 34 Spiegelsymmetrische Anordnung eines 50 S Dimeren
- Fig. 35 Schematische Darstellung der Präparatverhältnisse auf einer
a) einfachen Kohlefilmschicht
b) Kohlefilmdoppelschicht
- Fig. 36 Schematische Darstellung der Bilder der Figuren 31, 32, 33 und Positionen der Proteine L1, L19 und L27 auf den Partikelformen, gezeigt in Fig. 25.



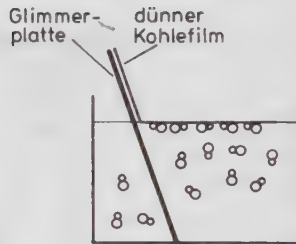
1



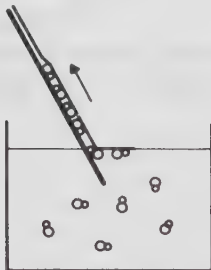
2



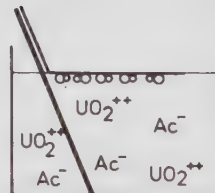
1 Aufschwimmen lassen des Kohlefilms auf die Ribosomenlösung



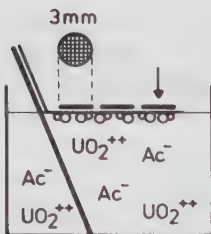
2 Diffusion und Adsorption



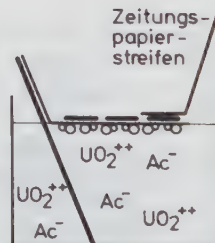
3 Herausnehmen des Kohlefilms, Überführen in die



4 Negativkontrastlösung

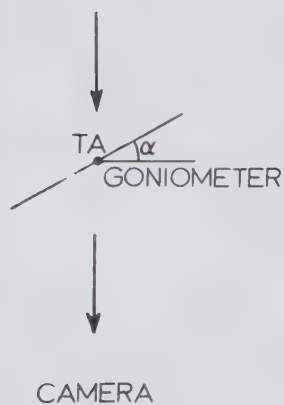


5 Aufbringen von Kupfernetzen, die einen dicken löchrigen Kohlefilm tragen

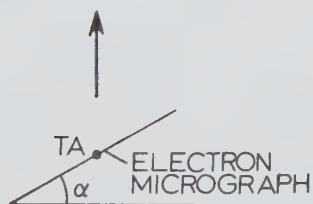


6 Abnehmen der Kupfernetze mittels Zeitungspapierstreifen

ELECTRON
BEAM



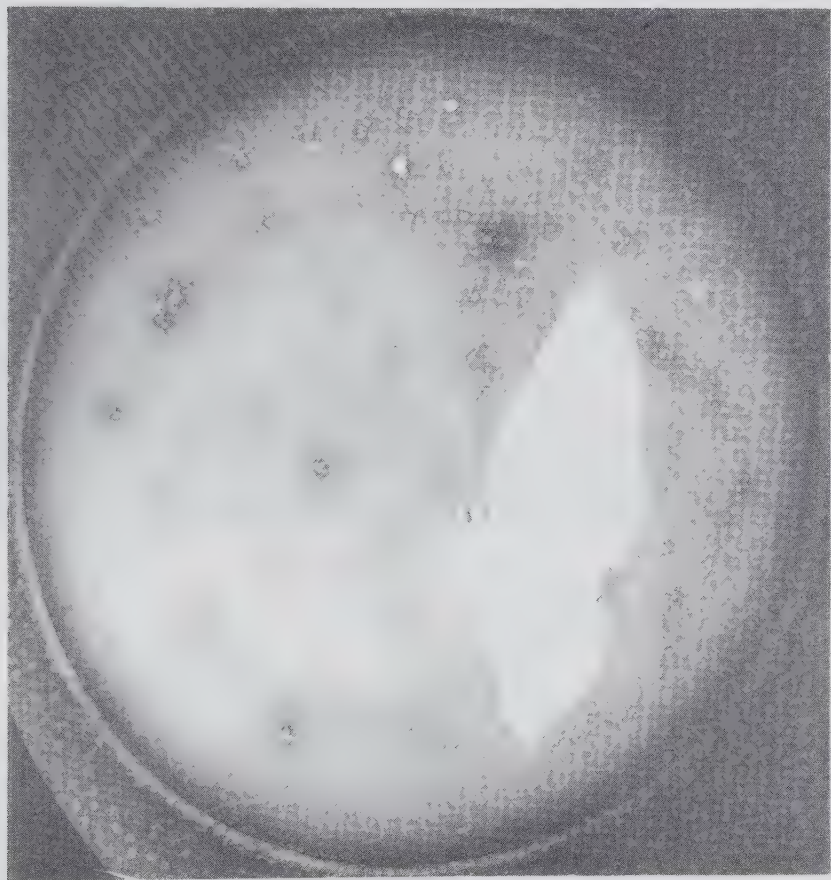
CAMERA

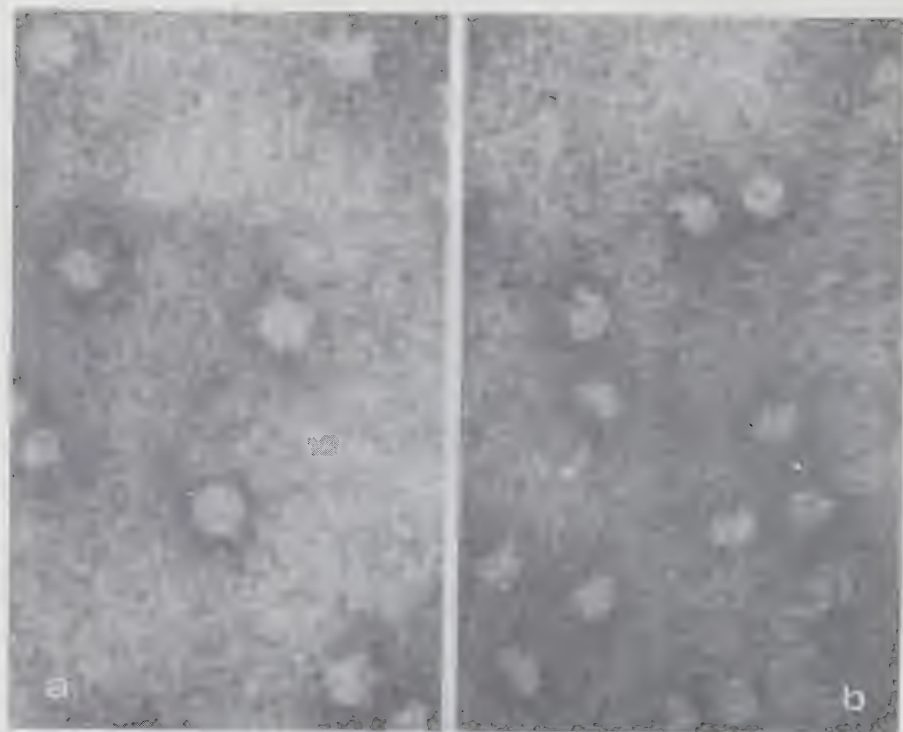




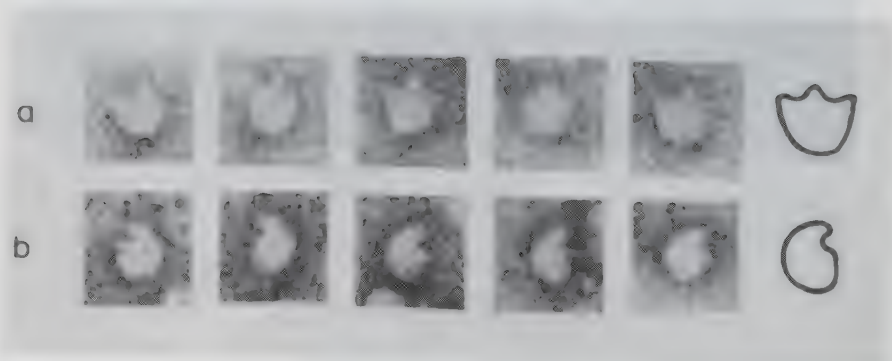




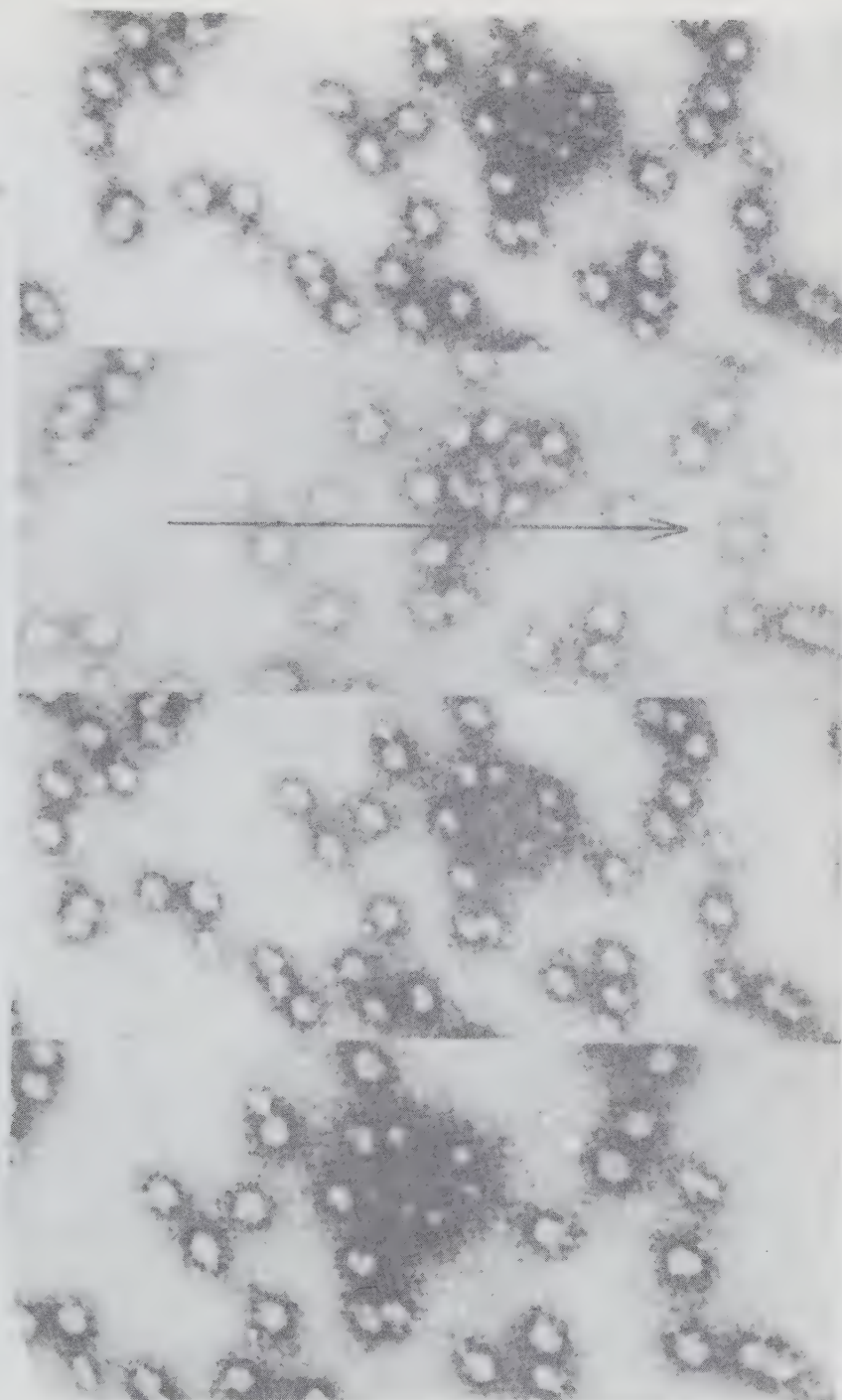


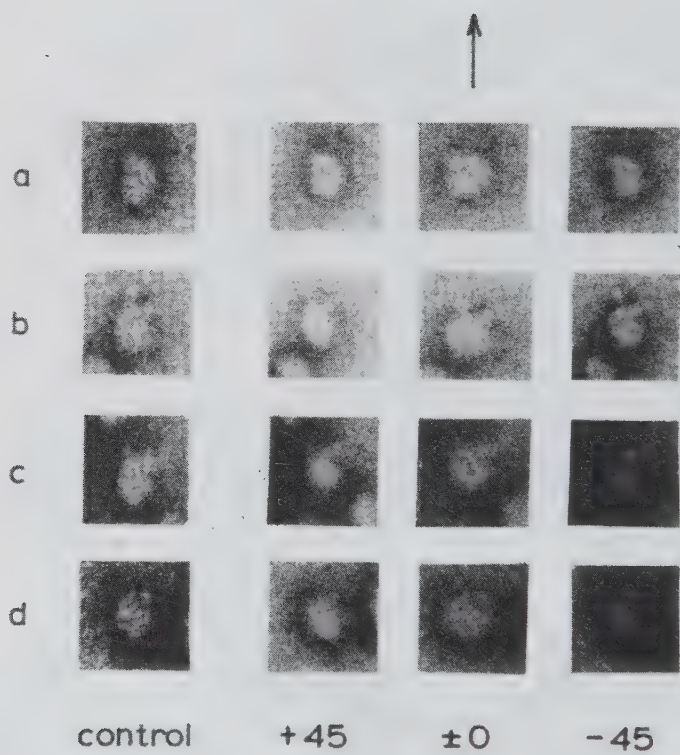


9



10

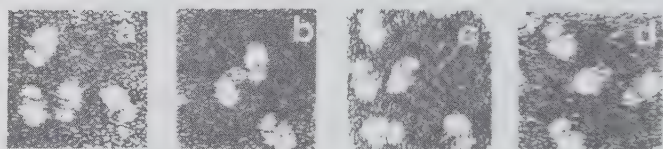




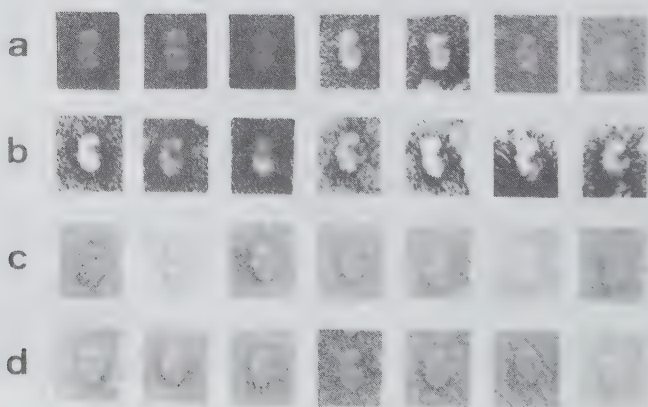




14



15



16

a



b



1



2



3

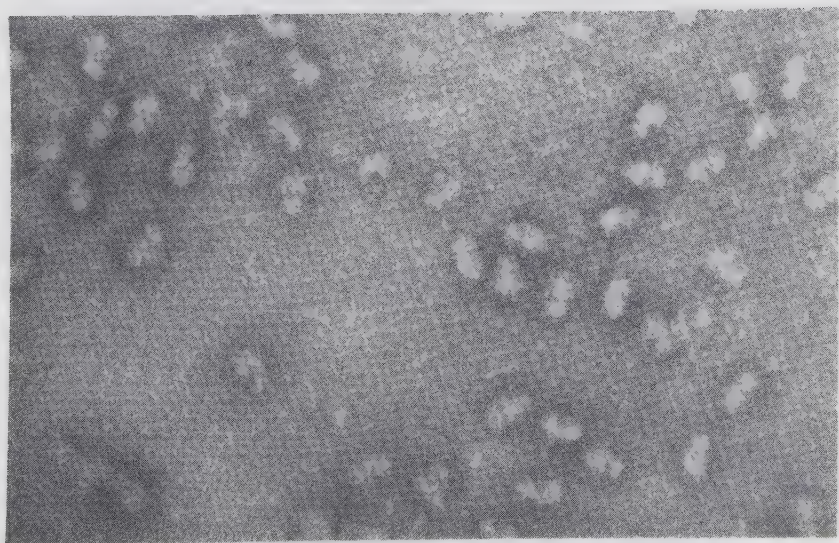


4

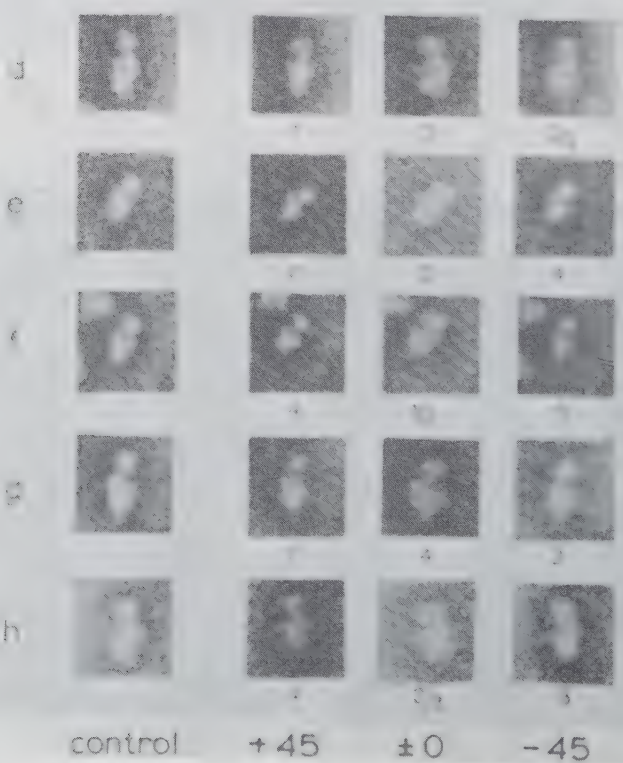
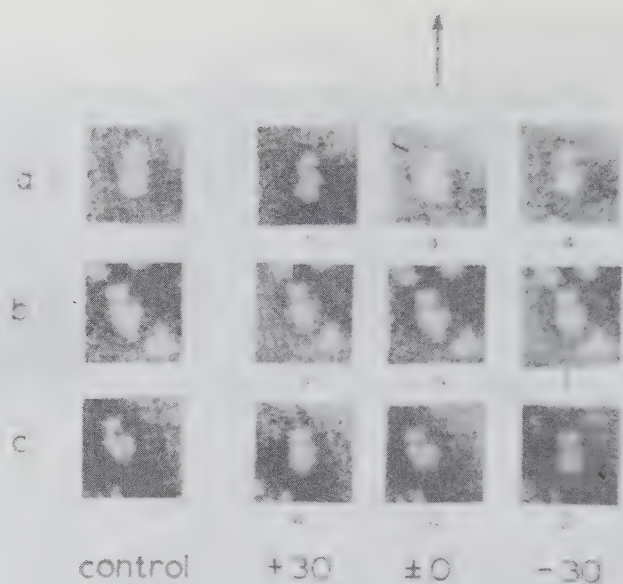


5

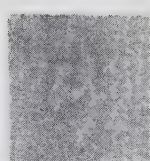
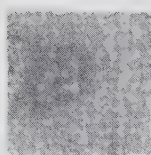
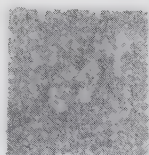
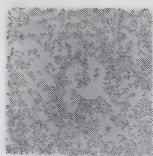
17



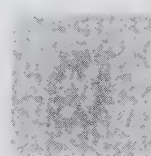
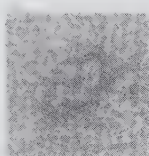
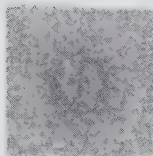
18



a



b



1

2

3

4

20



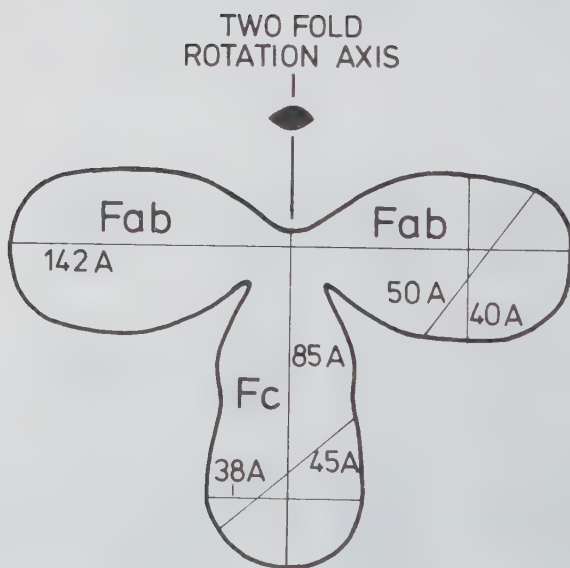
a

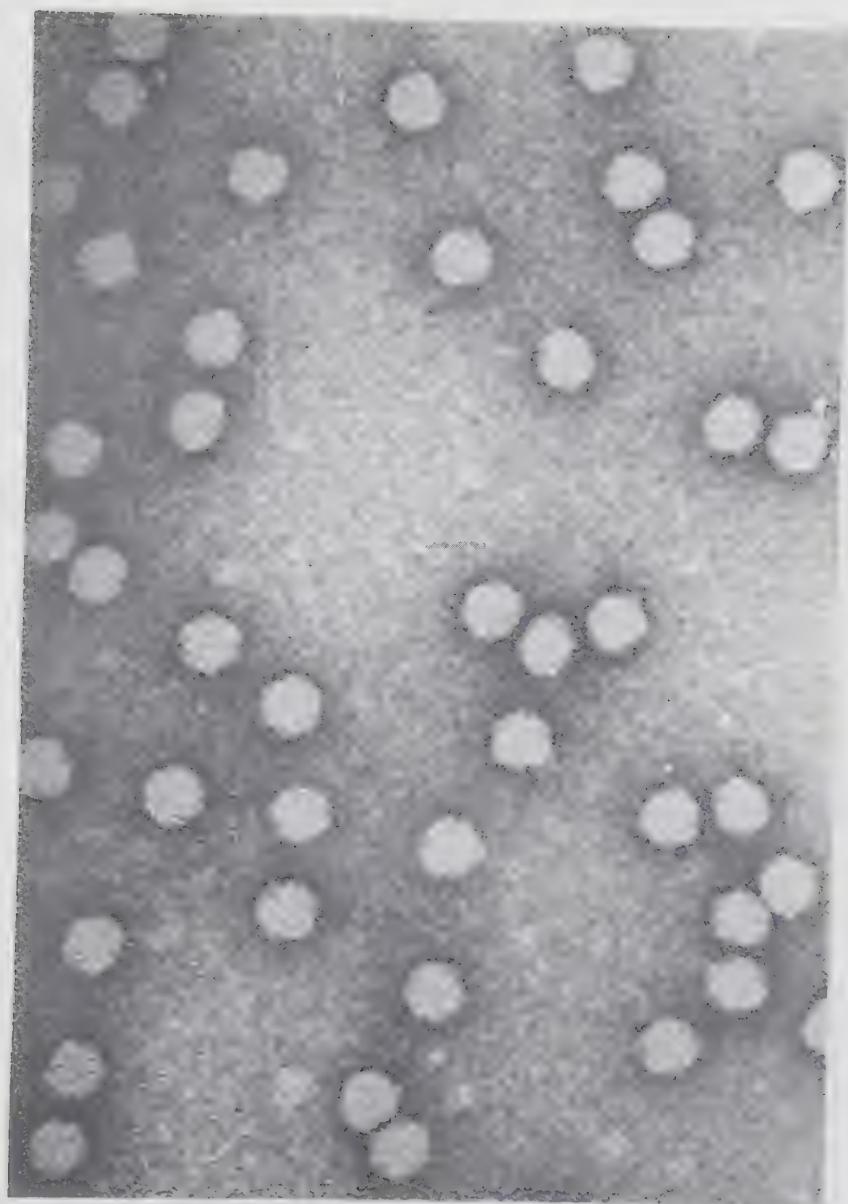
b

c

d

21







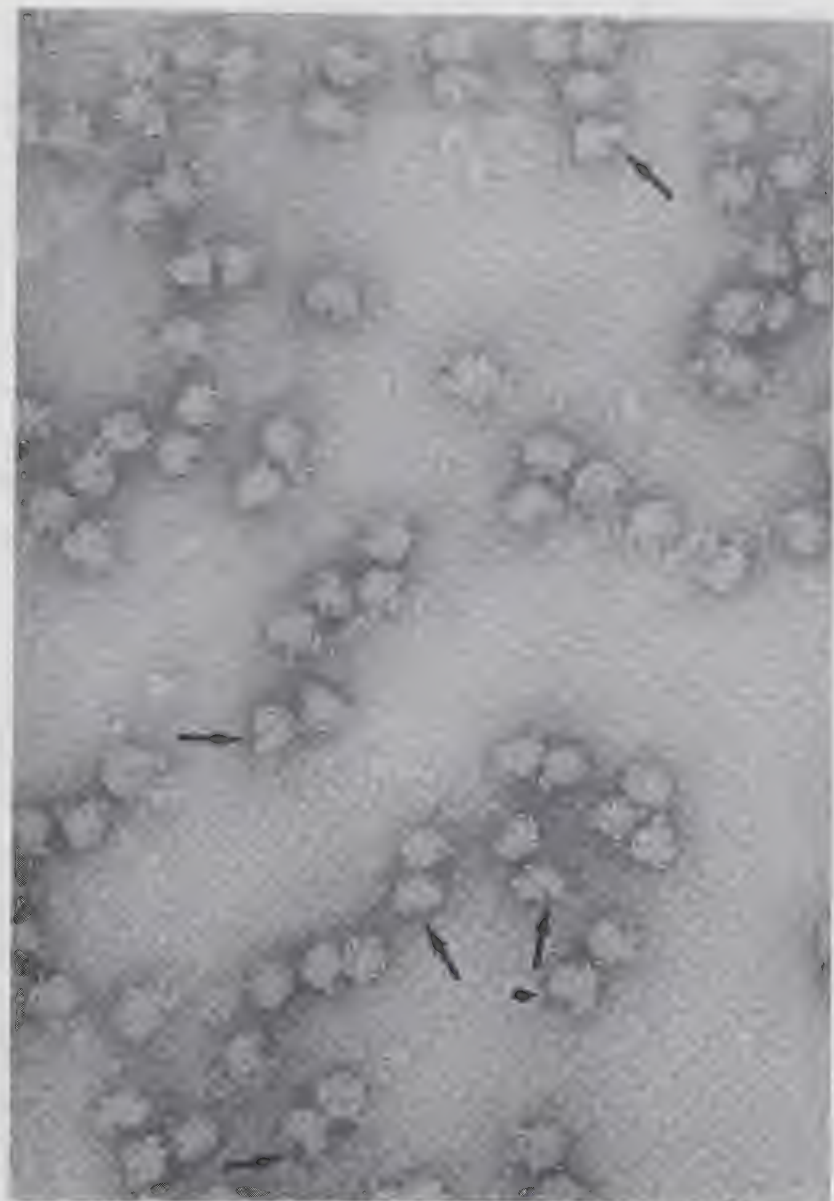


a



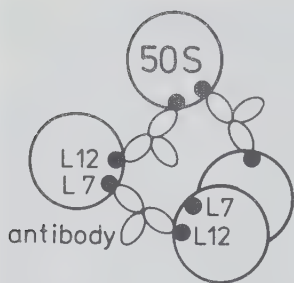
b



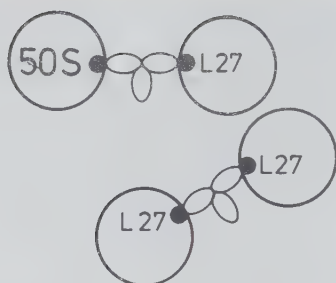








a

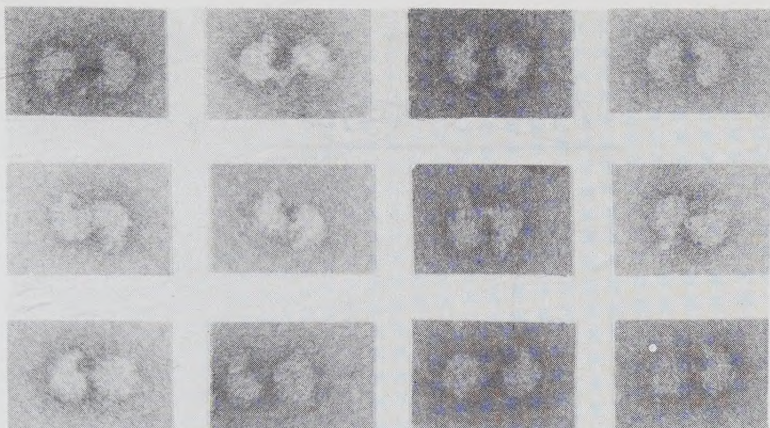


b

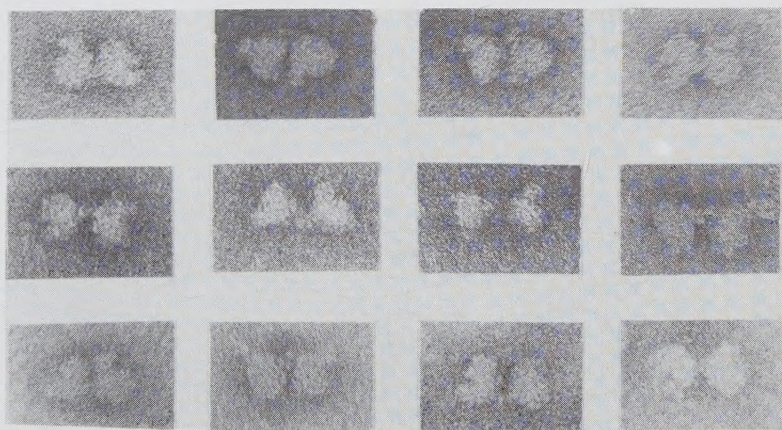
30



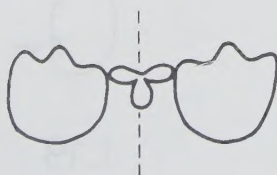
31



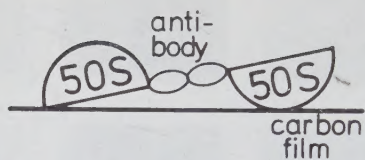
32



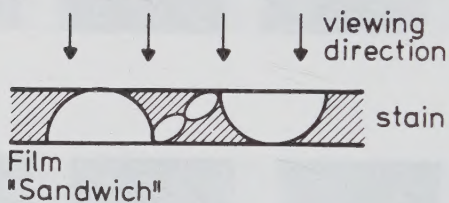
33



34

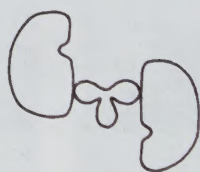
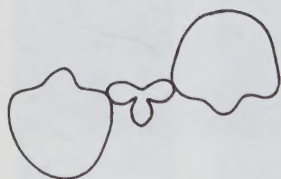


a



b

35



L1

L19

L27

36

